STUDIEN ZUR STRUKTURABHÄNGIGKEIT DER AMINODIACYLHYDRAZIN-UMLAGERUNG

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Günther Tscheulin

aus Lörrach

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546022_0008

STUDIEN ZUR STRUKTURABHÄNGIGKEIT DER AMINODIACYLHYDRAZIN-UMLAGERUNG

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Günther Tscheulin

aus Lörrach

1967

Genehmigt von der
Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der
Herren Professoren Dr. M. Brenner, Dr. C.A. Grob

Basel, den 21. April 1967

Prof. Dr. H. Huber
D e k a n

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. M. Brenner

im Institut für organische Chemie der Universität Basel ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. M. Brenner möchte ich für all die wertvollen Diskussionen, für seine Hilfe und für das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse herzlichst danken.

Meinen lieben Eltern

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Seite

THEORETISCHER TEIL

A. Einleitung 11

B. Beschreibung der ADU 15

I. Reaktionsgeschwindigkeit 15

II. Natur der Katalyse und sterische Verhältnisse bei der ADU 17

C. Weitere Studien zur Strukturabhängigkeit der ADU 21

I. Problemstellung 21

II. Variation an der passiven Aminosäure 21

1. Raumerfüllung 25

2. Funktionalität 25

III. Sonderfall der Glutaminsäure 26

1. pK-Werte von Z-L-Glu-hy-L-PheH (OH) 27

2. Zuordnung der drei Dissoziationskonstanten von Z-L-Glu-hy-L-PheH (OH) 28

a) Vergleich von Dissoziationsenthalpien 28

b) Existenzbereich für die Neutralform von Ampholyten 30

3. Autokatalyse bei der Umlagerung von Z-L-Glu-hy-L-PheH (OH) 33

IV. Variation an der aktiven Aminosäure 35

V. Zur Praxis der Umlagerung 37

1. Umlagerungsmedien 37

2. Nachweis von Glycindiketopiperazin als Nebenprodukt 37

3. Isolierung der Umlagerungsprodukte als Hydrazone von Salicylaldehyd 39

4. Diskussion der Ergebnisse 40

Seite

D. Studien zum Racemisierungsproblem: Die Erhaltung der Asymetrie am optisch aktiven Zentrum der passiven Aminosäure 41

I. Allgemeines zur Racemisierung von Aminosäure-Resten 41

1. Oxazolon-Mechanismus 41

2. Direkte basenkatalysierte Proton-Abspaltung 46

a) Einfluß der N-Acylierung 47

b) Einfluß der Carboxyl-Alkyl- bzw. Arylierung 48

c) Einfluß der Seitenkette 48

II. Potentielle Racemisierungseffekte bei der ADU 50

1. Die N-Schutzgruppe 50

2. Die carboxyl-aktivierende Gruppe 50

3. Die Seitenkette 51

4. Das Reaktions-Milieu 51

III. Konventionelle Bestimmung des Racemisierungsgrades 52

1. Der Anderson-Test 52

2. Der Young-Test 52

3. Der Weygand-Test 52

4. Anwendungsmöglichkeiten bei der ADU 53

IV. Der Empimerisierungs-Test zur Bestimmung des Racemisierungsgrades bei Einlagerungs-Reaktionen 53

1. Stereochemie von Threonin und Allothreonin 53

2. Durchführung der Versuche 54

3. Ergebnisse der Versuche 54

E. Pd-katalysierte Luftoxydation von Hydraziden 57

I. Die Polyvalenz der Hydrazidgruppe 57

II. Oxydative Aktivierung von Säurehydraziden in der Peptidsynthese 59

III. Eine neue Möglichkeit zur oxydativen Aktivierung von Säurehydraziden 61

1. Pd als Sauerstoffüberträger 61

2. Anwendung in der Peptidsynthese 63

Seite

F. Zur Abspaltung des Hydrazidrestes 64

I. Befunde von W. Hofer 64

II. Oxydation des Schwefels bei Cystein- und Methioninderivaten 64

G. Eine neue Möglichkeit zur Titration von Cystein- und Methioninderivaten mit Hypobromit 67

H. Herstellung der Ausgangsmaterialien 68

I. Hydrazide 68

1. Hydrazinolyse von N-geschützten Aminosäure- bzw. Peptidestern 69

a) Allgemeine Bemerkungen 69

α) sterische Hinderung 70

β) Schutzgruppen 72

γ) Funktionalität der Seitenkette 73

δ) Glutaminsäure 75

α') Partielle Hydrolyse der Diester 75

β') Umsatz des Monosalzes mit Alkylhalogeniden 75

γ') Ringöffnung von N-Acyl-Glutaminsäureanhydriden durch Nukleophile 76

b) Anwendung der Methode in der vorliegenden Arbeit 81

2. Indirekte Hydrazidierung: Sonderfall der Asparaginsäure 82

II. Aminodiacylhydrazine hergestellt nach dem N'-Carboxyanhydridverfahren 87

1. Allgemeines zur Reaktion von Basen mit α-Aminosäure-N-carboxyanhydriden 87

2. Anwendung der Methode in der vorliegenden Arbeit 88

EXPERIMENTELLER TEIL

	Seite
A. Übersicht über einige analytische und präparative Methoden	92
I. Dünnschichtchromatographie	92
II. Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Herstellung der Ausgangsmaterialien	95
a) Veresterung von N-Acyl-aminosäuren mit Diazomethan	95
b) Hydrazinolyse von N-Acyl-aminosäureestern	95
c) Herstellung von Aminosäure-N-carboxyanhydriden nach der Phosgenmethode	95
III. Qualität der am meisten verwendeten Lösungsmittel	96
B. Synthesen von N-(Acyl)-N'-(α-aminoacyl)-hydrazinen	97
I. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von α-Amino-diacylhydrazinen nach dem Carboxyanhydridverfahren	97
II. Genaue Vorschriften zur Herstellung von α-Amino-diacylhydrazinen	97
1. N-(Z-DL-Alanyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	97
2. N-(Z-DL-Phenylalanyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	98
3. N-(Z-DL-Leucyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	99
4. N-(Z-DL-Seryl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	100
5. N-(Z-DL-Threonyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	100
6. N-(Z-DL-Allothreonyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	101
7. N-(Z-L-Tyrosyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	102
8. N-(Z-S-Bz-L-Cysteinyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	103
9. N-(Z-DL-Methionyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	103
10. N-(N^{α}-Z-N^{ε}-BOC-L-Lysyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	104
11. N-(N^{α}-Z-N^{ε}-Z-L-Lysyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	105
12. N-(Z-L-Tryptophyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	106
13. N-(Z-L-Histidyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin	107
14. N-(Z-L-Aspartyl-β-Benzylester)-N'-(Glycyl)-hydrazin	107
15. N-(Z-L-Asparaginyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin	108
16. N-(Z-L-Glutaminyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin	109
17. N-(Z-L-Glutamyl-γ-Methylester)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin	109

Seite

18. N-(Z-L-Glutamyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin-Hydrochlorid 110
19. N-(Z-L-Glutamyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin 111
20. N-(Z-L-Prolyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin 111
21. N-(Z-Glycyl)-N'-(Prolyl)-hydrazin 112
22. N-(Z-Glycyl)-N'-(Sarcosyl)-hydrazin 112
23. N-(Z-DL-Phenylalanyl)-N'-(Sarcosyl)-hydrazin 113
24. N-(Z-DL-Threonyl)-N'-(Sarcosyl)-hydrazin 114

C. Synthesen von N-Benzyloxycarbonyl-aminosäurehydraziden nach dem Verfahren der ADU 116

I. Z-DL-Alanyl-Glycyl-hydrazid 116
II. Z-DL-Phenylalanyl-Glycyl-hydrazid 116
III. Z-DL-Leucyl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 117
IV. Z-DL-Seryl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 118
V. Z-DL-Threonyl-Glycyl-hydrazid 118
VI. Z-DL-Allothreonyl-Glycyl-hydrazid 119
VII. Z-L-Tyrosyl-Glycyl-hydrazid 119
VIII. S-Bz-N-Z-Cysteinyl-Glycyl-hydrazid 120
IX. Z-DL-Methionyl-Glycyl-hydrazid 120
X. N^{α}-Z-N^{ε}-BOC-L-Lysyl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 121
XI. N^{α}-Z-N^{ε}-Z-L-Lysyl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 122
XII. Z-L-Tryptophyl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 122
XIII. Z-L-Histidyl-L-Phenylalanyl-hydrazid 123
XIV. Z-L-Aspartyl-β-Benzylester-Glycyl-hydrazid 123
XV. Z-L-Glutaminyl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 124
XVI. Z-L-Glutamyl-γ-Methylester-L-Phenylalanyl-hydrazid 125
XVII. Z-L-Glutamyl-L-Phenylalanyl-hydrazid 125
XVIII. Z-L-Prolyl-Glycyl-hydrazid 126
XIX. Z-L-Glycyl-L-Prolyl-hydrazid 126

Seite

D. Synthesen der Vergleichsverbindungen 128

I. Z-DL-Alanyl-Glycyl-hydrazid 128

II. Z-DL-Phenylalanyl-Glycyl-hydrazid 128

III. Z-DL-Leucyl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 129

IV. Z-DL-Seryl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 129

V. Z-DL-Threonyl-Glycyl-hydrazid 130

VI. Z-DL-Allothreonyl-Glycyl-hydrazid 131

VII. Z-L-Tyrosyl-Glycyl-hydrazid 131

VIII. S-Bz-N-Z-L--Cysteinyl-Glycyl-hydrazid 132

IX. Z-DL-Methionyl-Glycyl-hydrazid 133

X. N^{α}-Z-N^{ε}-BOC-L-Lysyl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 133

XI. N^{α}-Z-N^{ε}-Z-L-Lysyl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 134

XII. Z-L-Tryptophyl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 135

XIII. Z-L-Histidyl-L-Phenylalanyl-hydrazid 136

XIV. Z-L-Glutaminyl-Glycyl-Salicyl-hydrazon 137

XV. Z-L-Glutamyl-L-Phenylalanyl-hydrazid 138

XVI. Z-L-Prolyl-Glycyl-hydrazid 138

E. Autokatalytische Umlagerung von Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH 140

F. Potentiometrische Titration zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH 141

I. Durchführung der Messungen 141

II. Meßergebnisse 141

III. Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten 142

G. Dünnschichtchromatographische Verfolgung der ADU von Aminodiacylhydrazinen mit Iminosäuren auf der aktiven Seite 143

H. Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Racemisierung 144

I. Hydrolyse 144

II. Chromatographie 144

Seite

I. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Glycindiketopiperazin als Nebenprodukt bei der ADU 147

K. Pd-katalysierte Oxydation von Hydraziden 148

I. Oxydation von Acetylhydrazid 148

1. In Gegenwart von Luft 148

2. N_2-Atmosphäre 148

3. O_2-Atmosphäre 148

II. Anwendung in der Peptidsynthese 149

1. Hippuryl-Glycin 149

2. Z-Glycyl-L-Phenylalanin 150

3. Z-Glycyl-DL-Phenylalaninmethylester 150

L. Titration von Cystein- und Methioninderivaten mit Hypobromit 152

I. Reagens, Titerbestimmung und Indikator 152

II. Durchführung der Titrationen 152

1. Substanzen 152

2. Titereinstellung 153

3. Messungen 153

M. Herstellung neuer Ausgangsmaterialien 155

I. Z-L-Prolin-hydrazid 155

II. N^{α}-Z-N^{ε}-BOC-L-Lysin-hydrazid 155

III. Z-L-Asparagin-methylester 155

IV. Z-L-Asparaginsäure-dihydrazid 156

V. Z-L-Asparaginsäure-α-hydrazid-β-benzylester 156

VI. Z-L-Asparagin-hydrazid 157

VII. Z-L-Asparaginsäure-α-hydrazid 157

VIII. Z_3-L-Arginin-methylester 158

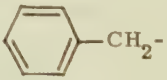
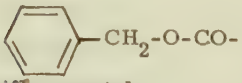
IX. Z_3-L-Arginin-cyanmethylester 158

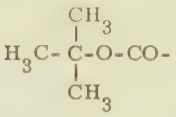
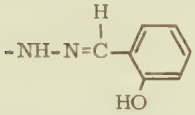
X. Z_3-L-Argininhydrazid 159

Zusammenfassung 160

Abkürzungen

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen und Symbole verwendet:

Abkürzung oder Symbol	Bedeutung
ADU	α-Aminodiacylhydrazin-Umlagerung
ZT.	Zimmertemperatur
MeOH	Methanol
EtOH	Ethanol
Ae	Aether
PeAe	Petrolaether
DMA	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
Me	Methyl H_3C—
Et	Ethyl H_5C_2—
ϕ	Phenyl
Bz	Benzyl 
Z	Benzyloxycarbonyl- (Carbobenzoxy-) 
TFA	Trifluoracetyl-

Abkürzung oder Symbol	Bedeutung
BOC	tert.-Butyloxycarbonyl- 
-hy	$-NH-NH_2$
-hy-	-NH-NH-
-hy-Sal	

Die Aminosäurereste sind nach E. Brand, Ann. N.Y. Acad. Sci. 47, 189 (1946), abgekürzt. Sie sind stets über ihr Carboxylende mit dem Rest - NHNH - verbunden.

Aus typographischen Gründen werden die α-Aminodiacylhydrazine folgendermaßen geschrieben:

Beispiele:

Z-DL-Ala-hy-GlyH = N-(Benzyloxycarbonyl-DL-Alanyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin

Z-L-Glu(OMe)-hy-L-PheH.HCl = N-(Benzyloxycarbonyl-L-Glutamyl-γ-Methylester)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin-Hydrochlorid

THEORETISCHER TEIL

A. Einleitung

Die Knüpfung einer Peptidbindung ist im Prinzip eine N-Acylierung. Sie geht so vor sich, daß der Stickstoff der zweiten Aminosäure mit dem Kohlenstoff der Carboxyl-Gruppe der ersten Aminosäure in Bindung tritt. Da Aminosäuren in neutraler, wässeriger Lösung als Zwitterionen vorliegen, haben sowohl Kohlenstoff als auch Stickstoff ihre Reaktionsfreudigkeit eingebüßt. Die Ausbildung einer Bindung ist nur unter Energieaufwand möglich, denn die Entladung des Zwitterions kostet mehr Freie Energie als die Bindungsänderungen liefern.

$$^{+}As^{-} + {}^{+}As^{-} \xrightarrow{+4000} {}^{+}Pep^{-} + H_2O$$

Die Verhinderung der Ionisation würde bereits die thermodynamischen Voraussetzungen schaffen, die zur Herstellung der Peptidbindung erfüllt sein müssen. Bei Verwendung esterfizierter Aminosäuren beispielsweise ist diese Situation gegeben. Die ΔF^{o}-Werte[1] der einzelnen Reaktionsstufen in den nachstehenden Kreisprozessen (a) und (b) machen dies deutlich.

$$\begin{array}{lccccc}
 & {}^{+}As^{-} & + & {}^{+}As^{-} & \xleftarrow{-4000} & {}^{+}Pep^{-} + H_2O \\
6500 & \downarrow & 6500 & \downarrow & & \uparrow -5200 \\
 & As & + & As & \xrightarrow{(a)\ -3800} & Pep + H_2O \\
1500 & \downarrow & 1500 & \downarrow & & \uparrow -1500 \\
 & AsOR & + & AsOR & \xrightarrow{(b)\ -1500} & Pep\text{-}OR + ROH
\end{array}$$

Unglücklicherweise ist jedoch mit Ausnahme von Enzymen kein wirksamer Katalysator für die Ester-Reaktion bekannt:

$$RCOOR' + NH_2R'' \xrightarrow[\text{Wasser}]{\text{Katalysator}} RCONHR'' + R'OH$$

Die Ester-Reaktion ist kinetisch unzulänglich und daher als Peptidsynthese unbrauchbar.

Zur Überwindung der Trägheit gibt es zwei Möglichkeiten:

a) Man kann $RCOOCH_3$ durch RCOX ersetzen, wobei X eine sogenannte

---

1) Die Zahlenangaben stellen ΔF^{o}-Werte in cal. dar.

aktivierende Gruppe darstellt. Der Ersatz von OCH_3 durch X bewirkt eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit (Verminderung der Arrhenius' schen Aktivierungsenergie), gleichzeitig wird jedoch der Freie Energie-Inhalt[1] von RCOX verglichen mit dem Freien Energie Inhalt von $RCOOCH_3$ vermehrt. Die Erhöhung der kinetischen Reaktivität hat unweigerlich eine Abnahme der Selektivität zwischen möglichen Reaktionswegen zur Folge[2], und die Vergrößerung des Freien Energie-Inhaltes ist zwangsläufig mit einer Vermehrung der Reaktionsmöglichkeiten verbunden[3].

Ungeachtet dieser Nachteile pflegt man in der Peptidchemie diesen Reaktionsweg zu beschreiten. Als Folge davon sind die Ausbeuten selten quantitativ, statt dessen treten Nebenprodukte und Racemisierung auf. Die Aktivierung durch Einführung von X hat zu einer ungewollten Überaktivierung geführt. Diese Überaktivierung begünstigt die spontane Zersetzung von RCOX, unerwünschte Reaktionen von RCOX mit ungeschützten funktionellen Gruppen und schließlich die Racemisierung. Letztere ist eine Folge der Oxazolonbildung, die ihrerseits darauf zurückzuführen ist, daß sie dem Molekül eine Möglichkeit zur Verminderung seines überhöhten Freien Energie-Inhaltes bietet.

Zusammenfassend kann also zu a) festgehalten werden: RCOX ist "überaktiviert" wenn es einen Überschuß an treibender Kraft besitzt, welche Nebenreaktionen ermöglicht. Verzichten wir auf den Überschuß z.B. bei $X=OCH_3$, so verhindern wir mit den Nebenreaktionen auch den Ablauf der gewünschten Hauptreaktion.

b) Man kann im Hinblick auf die Arrhenius-Gleichung das kinetische Problem auch auf eine andere Art anpacken, indem wir den Häufigkeitsfaktor A anstelle des Exponenten $\frac{E}{RT}$ ins Auge fassen.

$$k = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}}$$

---

1) Als Maß für den Freien Energie-Inhalt kann man in erlaubter Näherung die Wärmetönung der Reaktion $RCOX + H_2O \longrightarrow RCOOH + HX$ benützen.

2) z.B. Selektivität zwischen Hydrolyse und Aminolyse von RCOX.

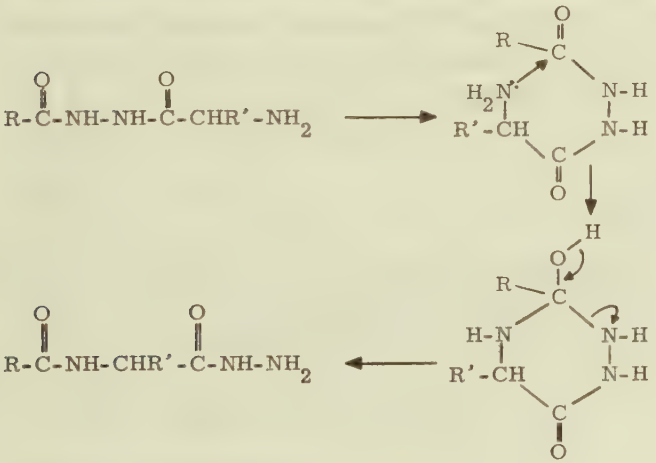
3) RCOX $\xrightarrow[\text{intramolekular}]{\text{(a)}H_2O}$ RCOOH + HX
(b) Oxazolon

Diese Betrachtungsweise ist besonders dann gerechtfertigt, wenn die Trägheit einer Reaktion eher einem niederen Wert von A als einem hohen Wert von E zugeschrieben werden kann. Unter solchen Umständen kann nämlich eine praktisch ins Gewicht fallende Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Vergrößerung des Häufigkeitsfaktors A erzielt werden; wir können sogar die kinetische Wirksamkeit einer X-Gruppe herabsetzen falls wir nur A groß genug machen, und bei konsequenter Verfolgung dieser Möglichkeit jede Überaktivierung ausschalten.

Wie allgemein bekannt, hängt A von der Anzahl und Art der Zusammenstöße zwischen den reaktiven Zentren ab. A ist dann besonders groß, wenn die Zusammenstöße zwischen Partnern des gleichen Moleküls stattfinden. Wollen wir also Peptidbindungen bei minimaler Aktivierung knüpfen, so müssen wir die Aminogruppe so nahe und in solcher Richtung an die gewünschte Carbonylgruppe heranbringen, daß sie einzig und allein mit dieser einen Carbonylgruppe reagieren kann.

Als Beispiele für die auf intramolekularem Wege entstehende Amidbindung sei die Umlagerung von O-Glycyl-Serin zu N-Glycyl-Serin[1], die Umlagerung von Aminodiacylimiden[2] zu Dipeptidamiden und die ADU[3] erwähnt. Letztere ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Der wahrscheinliche Reaktionsablauf der ADU ist der folgende



Anmerkungen siehe Seite 14

Den genannten Reaktionen ist gemeinsam, daß die ins Peptid einzuführende Aminosäure zunächst über ihre Carboxylgruppe an einen Akzeptor wie Serin-Hydroxyl, Amidstickstoff oder wie in unserem Falle Hydrazinstickstoff gebunden wird. Dieser Reaktionsschritt kann sehr wohl mit kinetisch hoher Aktivierung durchgeführt werden. Das dadurch gebildete Molekül hingegen ist schwach aktiviert.

In der Tat aktiviert im Aminodiacylhydrazin der Formel:

$$R\text{-}CO\text{-}NH\text{-}NH\text{-}OCCHR'NH_2$$

der Aminoacylhydrazid-Rest $-NH-NH-OC-CHR-NH_2$ den Rest $R-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$ nur schwach, denn eine intermolekulare Reaktion der Art

$$R''NH_2 \; + \; RCO\text{-}NH\text{-}NH\text{-}OC\text{-}CHR''NH_2$$

$$\downarrow$$

$$R''NH\text{-}OCR \; + \; NH_2\text{-}NH\text{-}OC\text{-}CHR''NH_2$$

findet nicht statt.

Zukünftig wird die α-Aminodiacylhydrazin-Umlagerung kurz mit ADU bezeichnet. Da ihre Beschreibung etwas umständlich ist, wollen wir zur Vereinfachung folgende Terminologie einführen:

Wenn man die Umlagerung als Folge einer intramolekularen Carbonyl-Addition betrachtet, so kann man die Aminosäure mit der nukleophil angreifenden Aminogruppe als die aktive - die Aminosäure mit dem angegriffenen Carbonyl als die passive Aminosäure bezeichnen. Es ist also die passive Aminosäure im Ausgangshydrazid vorgegeben; die aktive Aminosäure tritt über die Aminodiacylhydrazin-Zwischenstufe in dieses Hydrazid ein und wird dabei zur passiven Aminosäure des nachfolgenden Reaktionszyklus.

Anmerk. von S. 13:

1) M. Bergmann, A. Miekeley, Z. Physiol. Chem. 140, 128 (1924)

2) Th. Wieland, H. Mohr, Ann. Chem. 599, 222 (1956)
TH. Wieland, H. Urbach, Ann. Chem. 613, 84 (1958)

3) M. Brenner, W. Hofer, Helv. 44, 1794 (1961)

B. Beschreibung der ADU

α-Aminodiacylhydrazine lagern sich in Gemischen, bestehend aus einer Neutralkomponente wie Dioxan, DMF, DMA etc., und einer Säurekomponente wie Eisessig, Pivalinsäure, Propion-etc., zu Acyl-α-aminosäurehydrazide um.

I. Reaktionsgeschwindigkeit

Die Reaktionsgeschwindigkeit der ADU hängt von verschiedenen Faktoren ab:

1. Neutralkomponente

Maximale Umlagerungsgeschwindigkeiten weisen solche Neutralkomponente auf mit niederen Dielektrizitätskonstanten: bei Solventien wie Tetrahydrofuran, Dioxan, N,N-Dimethylacetamid verläuft die Reaktion schneller als mit den amphoteren Alkoholen.

2. Natur der Säurekomponente

Die Umlagerungsgeschwindigkeit hängt außer von der Natur der Neutralkomponente und dem Säuregehalt des Milieus auch von der Natur der Säurekomponente ab. Beispielsweise läßt sich bei gegebener Neutralkomponente mit Propion- (pK_{H_2O} = 4.87) oder Pivalinsäure (pK_{H_2O} = 5.03) eine größere Umlagerungsgeschwindigkeit erzielen als mit Essigsäure. (pK_{H_2O} = 4.76). Bei den erwähnten Säuren ist ersichtlich, daß sich eine umso größere Reaktionsgeschwindigkeit erzielen läßt, je geringer die Acidität der Säure in Wasser ist.[1)]

3. Temperatur

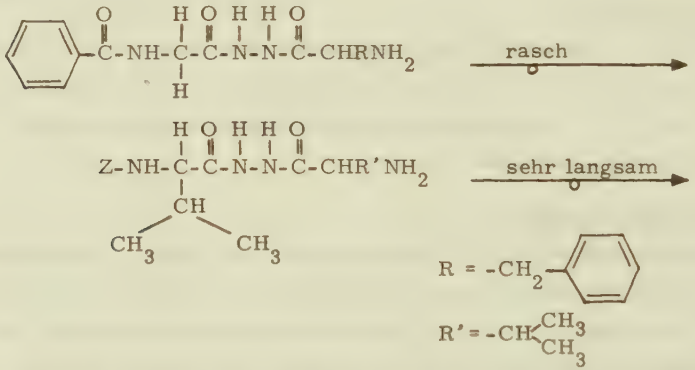
Messungen der Geschwindigkeitskonstanten der Umlagerungen im System Dioxan/Eisessig bei Variation der Temperatur und des Dioxan/Eisessig Verhältnisses zeigen, daß bei steigendem Essigsäuregehalt die Aktivierungsenergie größer, hingegen die Aktivierungsentropie weniger stark negativ wird. Versuche mit verschiedenen α-Aminodiacylhydrazinen haben gezeigt,

1) W. Hofer, M. Brenner, Helv. 47, 1625 (1964)
W. Hofer, Dissertation, Universität Basel, 1961

daß eine Temperatur von 40°C für die Durchführung der Umlagerung besonders günstig ist; bei höherer Temperatur treten in vermehrtem Maße Nebenreaktionen auf (z.B. Acylierung).[1)]

4. Struktur und induktive Effekte

Die Umlagerungsgeschwindigkeit verschiedener α-Aminodiacylhydrazine ist, unter gleichen Bedingungen durchgeführt, stark von der Natur der Komponenten abhängig. So verläuft die Umlagerung von Hip-hy-PheH mit einer für präparative Zwecke vernünftigen Geschwindigkeit (Halbwertszeit = 25 Minuten), hingegen erfolgt die Isomerisierung von Z-N-Val-hy-ValH äußerst langsam (Halbwertszeit = 40 Tage).



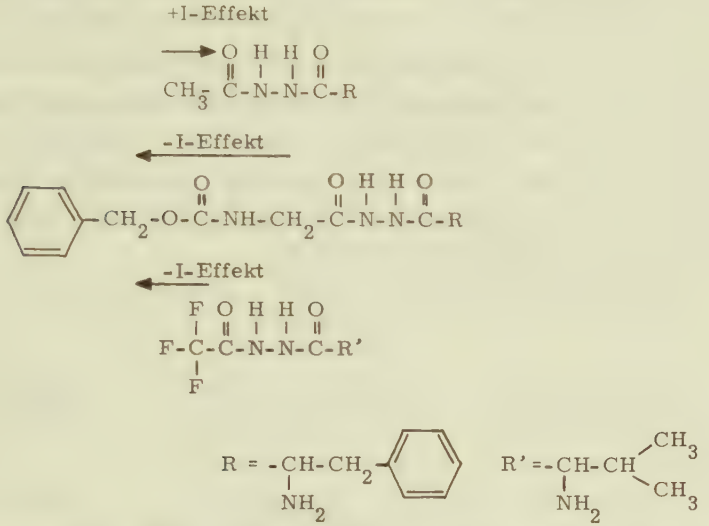
Der extrem langsame Verlauf dürfte vor allem auf die sterische Hinderung des nukleophilen Angriffs der Aminogruppe durch die Isopropylgruppe des Valins verursacht werden. Daß jedoch außer sterischen noch andere Faktoren von maßgebender Bedeutung sind, zeigt sich an folgenden Beispielen:

Die Umlagerungsgeschwindigkeit nimmt ab in der Reihenfolge:
Z-N-Gly-Gly-hy-PheH > Z-N-Gly-hy-PheH > Ac-hy-PheH.[2)]
Ac-hy-PheH lagert langsamer um als die andern, obschon hier gewiß die geringste sterische Hinderung vorliegt. Vielleicht dürfte dies auf die größere Elektronendichte am Acetylcarbonyl zurückzuführen sein. Die besonders

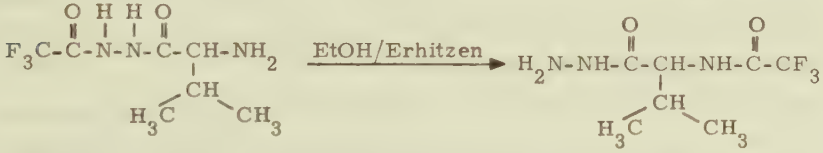
1) W. Hofer, M. Brenner, Helv. 47, 1625 (1964)

2) W. Hofer, Dissertation, Universität Basel, 1961.

große Umlagerungstendenz der N-Trifluoracetyl-N'-α-aminoacyl-hydrazine stützt diese Annahme.



So konnte Kirchner[1] durch bloßes Erhitzen in Alkohol (!!!) L-Valin-trifluoracetylhydrazin in N-Trifluoracetyl-Valinhydrazid überführen.



II. Natur der Katalyse und sterische Verhältnisse bei der ADU

Die ADU wird von Säuren katalysiert, die das Strukturelement -X$\langle^{OH}_{O}$ besitzen. Es scheint, daß bei der Umlagerung eines α-Aminodiacylhydrazins diese Säuren in prinzipiell gleicher Weise reagieren wie bei der Zyklinierung von Glutaminsäuredimethylester zu π-Glutaminsäure-methylester.[2]. Jedoch besteht hinsichtlich der Kinetik beider Reaktionen ein quantitativer

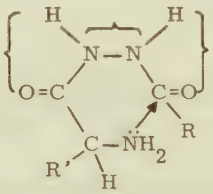
1) P. Kirchner, Diss. Univ. München, 1962

2) A. Huberts, R. Buyle, B. Hargitay, Helv. 46, 1429 (1963)

Unterschied: die Aktivierungsentropie ist im Falle der ADU negativer. Der langsamere Ablauf der Reaktion ist auf konformative Gegebenheiten zurückzuführen. Der Bildung eines γ-Lactonringes, bei welchem der Ring durch eine gesättigte Kohlenwasserstoffbrücke geschlossen ist, stellen sich keine konformativen Hindernisse entgegen. Bei der Isomerisierung eines α-Aminodiacylhadryzins liegen jedoch wesentlich ungünstigere Verhältnisse vor: damit der nukleophile Angriff der α-Aminogruppe auf das Acylcarbonyl-Kohlenstoffatom erfolgen kann, muß die Aminoacylamidgruppierung in der cis-Konformation vorliegen und die Acylgruppen müssen in Bezug auf die N-N-Bindung syn-periplaner angeordnet sein.

Acylgruppen
syn-periplanar

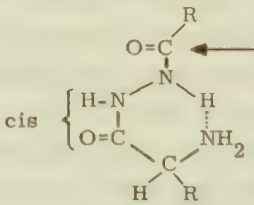
Amidbindung
muß cis sein



Amidbindung
trans oder cis

Hierin ist sowohl die syn-periplanare[1] Anordnung der Acylreste als auch die cis-Amidbindung auf der Aminoacylseite ungünstig. ("Eine N-monosubstituierte Carbon-amidgruppe liegt normalerweise bevorzugt in der sterisch günstigeren trans-Konfiguration vor")[2].

Bei den α-Aminodiacylhydrazinen könnte die Aminoacylamidgruppierung die für die Umlagerung erforderliche cis-Konfiguration aufweisen, da diese durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke stabilisiert werden kann.



1) Vergl. K. Klyne, V. Prelog, Experientia 16, 521 (1960)
2) Vergl. R. Huisgen, H. Walz. H. Brack, J. Glogger, Chem. Ber. 90, 1437 (1957)

Dadurch wird jedoch die Reaktionsmöglichkeit nicht verbessert, denn einerseits sind nun die Acylreste an den Hydrazinstickstoffen antiperiplanar angeordnet, andererseits wird durch eine solche H-Brücke die α-Aminogruppe blockiert.

Die für den Reaktionsablauf erforderliche Konformation bildet sich anscheinend erst in Gegenwart der Katalysatorsäure in hinreichendem Maße. Im System α-Aminodiacylhydrazin (A)-Katalysatorsäure (RCOOH)- Neutralkomponente (N) besteht ein Gleichgewicht zwischen A, RCOOH, Lösungsmittelmolekül, Assoziat, Ionenpaar, Ion und Produkt (B).[1)]

$$A \underset{}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} (A.HOOCR) \overset{K_2}{\rightleftharpoons} (A....HOOCR) \overset{K_3}{\rightleftharpoons} (AHOOCR) \overset{K_4}{\rightleftharpoons} AH^{\oplus} + {}^{\ominus}OOCR$$

$$(A....HOOCR) \overset{K_5}{\rightleftharpoons} (A....HOOCR)^{*} \rightarrow B$$

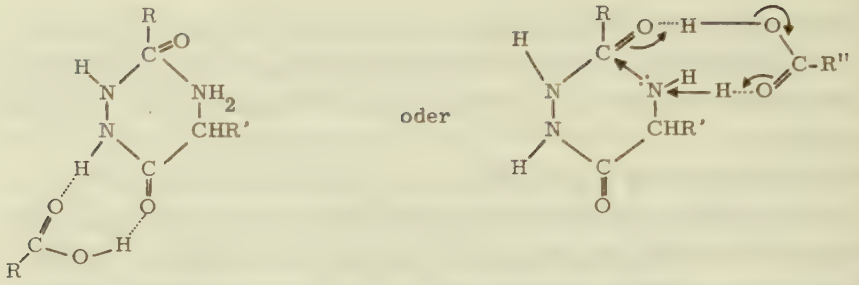
Hierbei bedeutet:

A	nicht protoniertes Ausgangsmaterial
(A·HOOCR)	einen Komplex
(A....HOOCR)	einen andern Komplex, bei dem willkürlich angenommen wird, daß er die eigentliche reaktive Partikel darstellt, die beispielsweise bei Zusammenstoß mit einem schnellen Lösungsmittelmolekül via transition state in das Produkt übergeht.
$(A....HOOCR)^{*}$	die "reaktive Partikel" im Übergangszustand
B	das Produkt
$(AH^{\oplus}{}^{\ominus}OOCCR)$	ein Ionenpaar
$AH^{\oplus}$	protoniertes Ausgangsmaterial

Im Sinne einer Modellvorstellung lassen sich für die "reaktive Partikel" folgende Strukturen denken:

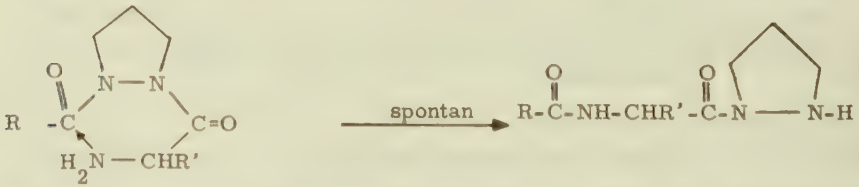
---

1) M. Brenner, Acta Chim. Hung, 44, 81 (1965)



(a) (b)

Fall (a) stellt die Stabilisierung der erforderlichen Konformation dar: die Carbonsäure hat die Funktion einer fixierenden Klammer.
Im Fall (b) haben wir ebenfalls eine Stabilisierung der Konformation und zusätzlich eine bifunktionelle Katalyse. Diese Modelle stehen mit der Tatsache in Einklang, daß hydroxylhaltige Lösungsmittel und andere Wasserstoffbrückendonatoren die Umlagerungsgeschwindigkeit herabsetzen. In Übereinstimmung mit der Klammerhypothese steht weiter die Tatsache, daß Substitution der Hydrazinwasserstoffatome durch Alkylgruppen die Umlagerungsgeschwindigkeit erhöht (cis-Amid-Konformation ist gegenüber der trans-Amid-Konformation weniger oder nicht mehr benachteiligt), und daß eine Trimethylenbrücke, welche die syn-periplanare Konformation der Acylgruppen erzwingt, die Umlagerungsgeschwindigkeiten um Größenordnungen erhöht (spontane Umlagerung der Aminodiacylhydrazine vom Pyrazolidit-Typus).



Die Umlagerung der Pyrazolidide erfolgt in der Tat so schnell, daß mit ihrer Verwendung das Umlagerungsproblem für die Praxis gelöst wäre, wenn nur die Aminoacylpyrazolidide sich ebenso leicht wie die Aminoacylhydrazide darstellen ließen.[1)]

1) Siehe Angew. Chem. 77, 54 (1965)

C. Weitere Studien zur Strukturabhängigkeit der ADU

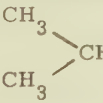
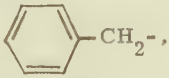
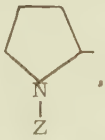
Nach den Ergebnissen von W. Hofer bestimmt bei Aminosäuren ohne funktionelle Gruppen in den Seitenketten vor allem die Raumerfüllung die Reaktionsgeschwindigkeit, und zwar sowohl auf der aktiven wie auf der passiven Seite. In Übereinstimmung mit der allgemeinen Erfahrung in der Peptidchemie wirkt ein voluminöser Substituent auf der passiven Seite, d.h. in α-Stellung zur angreifenden Carbonylgruppe, stärker reaktionsverzögernd als der gleiche Substituent auf der aktiven Seite, d.h. in α-Stellung zu der angreifenden Aminogruppe.

I. Problemstellung

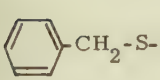
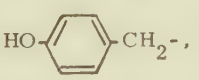
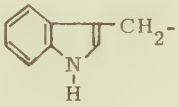
Es stellte sich nun die Frage, ob und wie diese Situation sich ändere, wenn die Seitenketten freie oder geschützte funktionelle Gruppen tragen. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Frage in bezug auf die passive Stellung abzuklären. Entsprechende Variationen auf der aktiven Seite sind zurückgestellt worden. Es sollte indessen zusätzlich geprüft werden, ob die Umlagerung auch dann erfolgt, wenn anstelle einer α-Aminosäure auf der aktiven Seite eine α-Iminosäure (Sarcosin, Prolin) tritt.

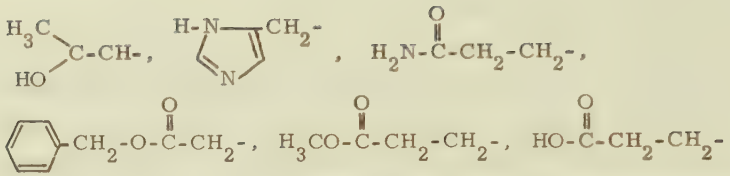
II. Variation an der passiven Aminosäure

Es sind mit Ausnahme von Arginin, Asparaginsäure und Hydroxyprolin sämtliche im Eiweiß vorkommenden Aminosäuren in passiver Stellung eingeführt worden, dazu kommen noch einige Aminosäuren mit maskierten funktionellen Gruppen. Es handelt sich um folgende Seitenketten:

Seitenketten: H_3C- ,  ,  ,  ,

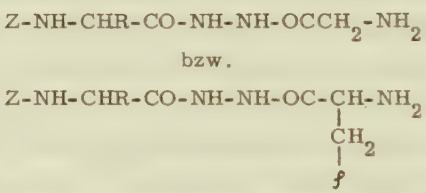
Z-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-, BOC-NH-CH_2-CH_2-$CH_2$$CH_2$-, H_3C-S-CH_2-CH_2-

 , OH-CH_2-, ,  , 



Auf der aktiven Seite stand Glycin oder in einigen Fällen Phenylalanin. Die Verwendung von Phenylalanin hat technische Gründe: Diese Aminosäure in aktiver Stellung neigt weniger zu Nebenreaktionen; die Produkte kristallisieren besser. Ihre Einlagerungsgeschwindigkeit ist etwa gleich groß wie jene von Glycin.

Gegenstand der Untersuchungen waren also Aminodiacylhydrazine der allgemeinen Formel:



mit den in obiger Tabelle angegebenen Resten R.

Als Lösungsmittel diente durchwegs Dioxan oder DMA unter Zusatz von 5 % Essigsäure oder in einigen Fällen von 3 Äquivalenten Pivalinsäure. Der Umlagerungsverlauf bei 40°C ist dünnschichtchromatographisch verfolgt worden; die Reaktionsdauer bis zur vollständigen Umsetzung kann so auf ± 2 Stunden genau bestimmt werden. Alle Umlagerungsprodukte sind durch präparative Isolierung sichergestellt worden. Auf diesen Punkt und auf andere experimentelle Einzelheiten kommen wir unten zurück.

Tabelle 1

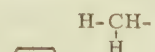
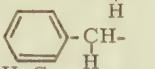
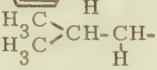
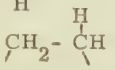
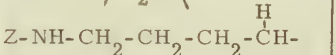
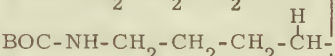
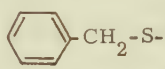
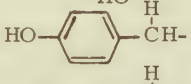
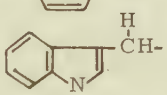
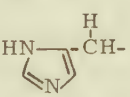
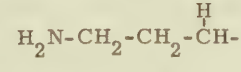
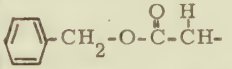
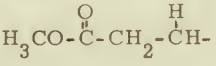
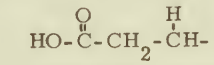
Verbindung	Seitenkette	Reakt.-Zeit/h	präpar. Ausbeute
Z-DL-Ala-hy-GlyH		20	62 %
Z-DL-Phe-hy-GlyH		22	63 %
Z-DL-Leu-hy-GlyH		23	67 % *
Z-L-Pro-hy-GlyH		20	68 %
Z-N$^{\alpha}$-Z-N$^{\varepsilon}$-L-Lys-hy-GlyH		48	80 % *
Z-N$^{\alpha}$-BCO-N$^{\varepsilon}$-L-Lys-hy-GlyH		36	77 % *
Z-DL-Met-hy-GlyH		21	77 %
S-Bz-N-Z-L-Cys-hy-GlyH		25	66 %
Z-DL-Ser-hy-GlyH		23	71 %
Z-DL-Thr-hy-GlyH		120	52 %
Z-DL-Allothr-hy-GlyH		120	40 %
Z-L-Tyr-hy-GlyH		25	53 %
Z-L-Try-hy-GlyH		29	51 % *
Z-L-His-hy-L-PheH		24	97 %
Z-L-Glu-hy-GlyH NH$_2$		34	61 % *
Z-L-Asp-hy-GlyH OBz		48	48 %
Z-L-Glu-hy-L-PheH OMe		24	72 %
Z-L-Glu-hy-L-PheH OH		11	90 %

Tabelle 1

von W. Hofer durchgeführt			
Verbindung	Seitenkette	Reaktions-zeit/h	präpar. Ausbeute
Hip-hy-DL-PheH	---	18	92 %
Z-Gly-hy-D-ValH	---	27	
Ac-hy-DL-PheH	---	32	
Z-D-Val-hy-D-ValH	H_3C H_3C >CH-	40 Tage !	

Die Umlagerungen wurden überwiegend in Dioxan/5 % Eisessig durchgeführt; für die in der Tabelle mit * markierten Verbindungen wurde DMA/3 Äquivalente Pivalinsäure als Umlagerungsmilieu verwendet.

Die mit ** markierten Ausbeuten bedeuten, daß die durch Umlagerung entstandenen Hydrazide als Hydrazone von Salicylaldehyd isoliert wurden. Die angegebenen Ausbeuten bedeuten in diesem Falle: isolierte Menge Hydrazon bezogen auf eingesetztes α-Aminodiacylhydrazin.

Tabelle 1 enthält die Ergebnisse der Untersuchung. Sie werden in den folgenden Abschnitten diskutiert, wobei wir unsere Aufmerksamkeit einerseits auf den Effekt der Raumerfüllung und andererseits auf jenen der Funktionalität richten wollen.

1. Raumerfüllung

Bei der Betrachtung von Kolonne 3 der Tabelle 1 fällt zunächst die lange Reaktionsdauer bei Threonin und Valin auf. Daraus darf man ganz eindeutig den Schluß ziehen, daß eine Verzweigung in β-Stellung die Umlagerungsgeschwindigkeit entscheidend verzögert.

In weiter entfernten Stellungen machen auch voluminöse Substituenten nicht mehr viel aus. Hierher gehören die Reste der aromatischen Aminosäuren, die ε-substituierten Lysine, S-Benzyl-Cystein und die β-ständige Benzylestergruppe bei der Asparaginsäure.

2. Funktionalität

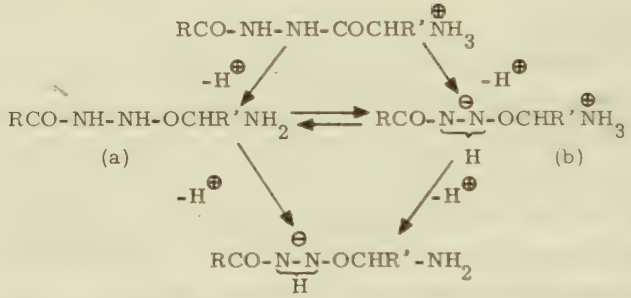
Wir hatten eigentlich erwartet, daß sich die Gegenwart funktioneller Gruppen auf die Umlagerungsgeschwindigkeit auswirken werde. Das Ergebnis ist in dieser Beziehung dürftig. Diese Sachlage ist einerseits enttäuschend und andererseits beruhigend. Es zeigt jedenfalls, daß die ADU eine Umsetzung darstellt, die mit erheblicher Konstanz abläuft. Solche Reaktionen sind in der Peptidchemie, wo man immer wieder mit der Individualität der einzelnen Aminosäuren zu kämpfen hat, besonders willkommen. Ein Blick auf Kolonne 3 der Tabelle 1 macht deutlich, daß das monotone Bild nur in einem einzigen Fall deutlich durchbrochen wird: Das γ-Carboxyl der Glutaminsäure übt ohne jeden Zweifel eine reaktionsbeschleunigende Wirkung aus. Eine genauere Untersuchung, auf die in Abschnitt III. dieses Kapitels nochmals Bezug genommen werden wird, hat ergeben, daß dem freien Carboxyl eine intermolekulare autokatalytische Wirkung zukommt. Diese genügt indessen nicht, um die in Gegenwart von 42 Äquivalenten Essigsäure beobachtete erhöhte Umlagerungsgeschwindigkeit befriedigend zu deuten.

Nun konnte zusätzlich gezeigt werden, daß das Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH in Wasser zwitterionischen Charakter besitzt. Es mag deshalb auch in Dioxan/Eisessig noch ein zwitterionischer Anteil vorliegen, was zur Ausbildung eines intramolekularen Ionenpaares mit einer für die Umlagerung günstigen Konformation führen könnte. Da solche Ionenpaare durch Protonenübergang vom Ammoniumstickstoff zum Carboxylatsauerstoff mit der umgeladenen, iso-

elektrischen Form im Gleichgewicht stehen, ist eine vom Ionenpaar ausgehende Umlagerung durchaus denkbar. Die allgemeine Konformation des dipolaren Zustandes bleibt auch im ungeladenen Zustand für eine Weile erhalten. Eine Überprüfung der Verhältnisse beim entsprechenden Asparaginsäure-Derivat mußte bisher wegen dessen schwerer Zugänglichkeit leider unterbleiben.

III. Sonderfall der Glutaminsäure

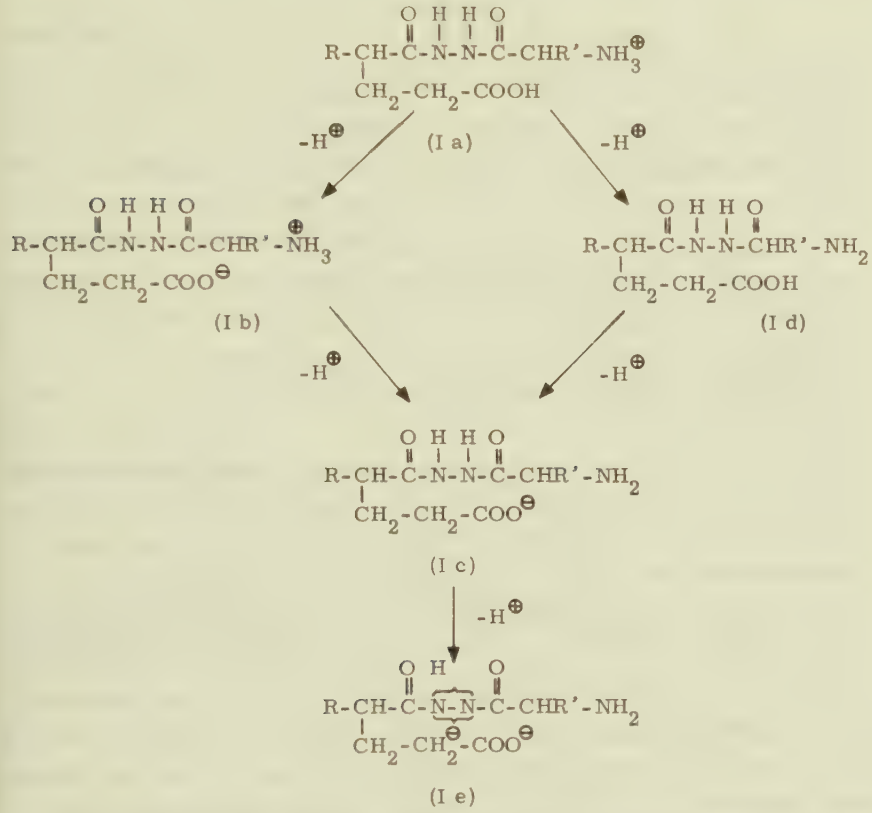
α-Aminodiacylhydrazine besitzen zwei Möglichkeiten der Protonendissoziation.



Durch Zuordnung der Dissoziationskonstanten konnte gezeigt werden, daß für die Struktur von α-Aminodiacylhydrazinen in wässerigem Medium Formulierung (a) den Vorzug zu geben ist. Welche Struktur aber bei α-Aminodiacylhydrazinen, die wie im Falle von N-(Z-L-Glutamyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin eine Carboxylgruppe im Molekül enthalten, vorliegt, war nicht klar. Durch Zuordnung der Dissoziationskonstanten konnte diese Frage geklärt werden.

1. pK-Werte von Z-L-Glu-hy-L-PheH
OH

Im Falle von Z-L-Glu-hy-L-PheH existieren 3 salzbildende Gruppen
OH



Die pK-Bestimmungen erfolgten durch Auswertung potentiometrischer Titrationen der Verbindung. Die Angaben über diese Titrationen und über die Berechnung der pK-Werte finden sich im experimentellen Teil dieser Arbeit. Tabelle 2 enthält nebst den Protolysenkonstanten von Z-L-Glu-hy-L-PheH
OH
auch einige der Literatur entnommene Daten. Letztere sind mit einem * versehen.

Tabelle 2

Scheinbare Dissoziationskonstanten von Z-L-Glu(OH)-hy-PheH und einigen α-Aminodiacylhydrazinen

Verbindung	pK_{COOH}	$pK^{\oplus}_{NH_3}$	pK -N(H)-N(H)-
Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH	4.23 ± 0.05	6.93 ± 0.05	9.73 ± 0.05
Z-Gly-hy-L-PheH*	-	6.67 ± 0.05	9.70 ± 0.05
Z-DVal-hy-D-ValH*	-	7.17 ± 0.05	10.02 ± 0.05
Ac-hy-DL-PheH*	-	6.73 ± 0.05	10.24 ± 0.05

2. Zuordnung der drei Dissoziationskonstanten von Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH-HCl

a) Vergleich von Dissoziationsenthalpien

R. Weber[1] berichtet darüber:

"Die Größenordnung der Enthalpieänderung bei der Dissoziation eines Protons aus einer Funktion HA ist mehr oder weniger charakteristisch für die Art dieser Funktion. Man kann daher durch Vergleich der Dissoziationsenthalpien einer unbekannten Gruppe HX mit den Dissoziationsenthalpien bekannter Stoffe HA_1, HA_2, HA_3, ... auf die Natur von HX schließen. Im Falle des N-(Z-L-Glutamyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin-Hydrochlorids besitzt das Molekül drei Gruppen HX, die bei Zugabe von Lauge nacheinander dissoziieren. Um zu entscheiden, ob das zuerst dissoziierende HX die Ammonium- oder die Carboxylfunktion ist, vergleicht man die Dissoziationsenthalpien mit jenen von Ammonium- und Carboxylgruppen.

$$R\text{-}\overset{\oplus}{N}H_3 \rightleftharpoons R\text{-}NH_2 + H^{\oplus} \qquad RCOOH \rightleftharpoons RCOO^{\ominus} + H^{\oplus}$$

mittels der thermodynamischen Beziehung:

$$\Delta H = RT^2 \frac{d \ln K}{dT}$$

lassen sich die Dissoziationsenthalpien aus der Temperaturabhängigkeit der

1) R. Weber, W. Hofer, W. Heer, M. Brenner, Helv. 44, 2154 (1961)

Dissoziationskonstanten berechnen. Die Dissoziationsenthalpie einer Funktion HA kann aus den, z.B. bei 25° und 42° bestimmten Dissoziationskonstanten gemäß der integrierten Form:

$$\Delta H = -2.303\, R \left(pK_{T_2} - pK_{T_1} \right) \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1}$$

berechnet werden.

Tabelle 3 enthält die Resultate. Das ΔH der ersten Dissoziationsstufe fällt eindeutig in das Intervall der Dissoziationsenthalpien von Carboxylgruppen, das ΔH der zweiten Stufe in jenes von Ammonium-Gruppen, und das ΔH der dritten Stufe ist mit der Dissoziationsenthalpie von N,N'-Diacetylhydrazin vergleichbar. Somit erfolgt offenbar im Gebiet des pK_1 der Übergang vom Ammonium-Salz (Ia) zum Zwitterion (Ib) durch Abgabe des Carboxylprotons; im zweiten Schritt entsteht die einfach negativ geladene Molekel (Ic) durch Abgabe des Ammoniumprotons (pK_2) und im dritten Schritt wird durch Abgabe eines Protons aus der Diacylhydrazingruppe (pK_3) das zweifach negativ geladene Anion (Ie) gebildet.

Wenn man die Enthalpie-Regel im vorliegenden Fall anwenden darf, so liegt Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH im Neutralzustand überwiegend als Zwitterion (Ib) vor.

Tabelle 3

Temperaturabhängigkeit der scheinbaren Dissoziationskonstanten und daraus berechnete Dissoziationsenthalpien von N-(Z-Glutamyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin.

		25.4° ± 0.2 ± 0.05	42.6° ± 0.2 ± 0.05	Δ pK Δ T=17.2°	ΔHcal ±2000
Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH	pK_1	4.23	4.26	0.03	-750
	pK_2	6.93	6.61	0.32	8000
	pK_3	9.73	9.53	0.20	4900
Bzo-Gly-hy-D-PheH 1)	pK_1	6.73	6.41	0.32	9100
	pK_2	9.60	9.43	0.17	5700
Ac-hy-Ac 1)	pK	10.86	10.75	0.11	3100
RNH_3^+ 2)					10000
RCOOH 2)					1000

1) s.R.Weber, W.Hofer, W.Heer, M.Brenner, Helv. 44, 2154 (1961)
pK-Werte wurden bei 25° und 40° bestimmt.
2) s.E.J.Cohn, J.T.Edsall, Reinhold Publ. Corpor., New York 1943 S. 82, 89.

b) Existenzbereich für die Neutralform von Ampholyten

Wird bei der Titration eines Ampholyten das Wasser ganz oder teilweise durch ein weniger polares Lösungsmittel (z.B. Aethanol) ersetzt, so verbreitert sich der "Existenzbereich der isoelektrischen Form" (pK_2-pK_1=ΔpK) gegenüber demjenigen bei der Titration in reinem Wasser, sofern die Neutralform der Verbindung vorwiegend als ungeladene Molekel vorliegt. Er wird hingegen enger, wenn bei der Neutralform die Zwitterionen überwiegen.

Diese Regel kann folgendermaßen begründet werden: γ_A/γ_B bedeutet das Verhältnis der Aktivitätskoeffizienten zweier an einem Gleichgewicht teilnehmender Stoffe A und B. Vergleicht man dieses Verhältnis, wenn die Stoffe einerseits in Wasser gelöst sind $(\gamma_A/\gamma_B)_{H_2O}$, mit demjenigen des gleichen Stoffpaares in einem weniger polaren Lösungsmittel M $(\gamma_A/\gamma_B)_M$, so ist $(\gamma_A/\gamma_B)_{H_2O} < (\gamma_A/\gamma_B)_M$, wenn A mehr Bruttoladung trägt als B. Steht also eine Säure HY mit einer konjugierten Base Y im Gleichgewicht, so verschiebt sich beim Übergang in ein weniger polares Lösungsmittel, bei gleichbleibender Aktivität von $H^{\oplus}$, das Aktivitätskoeffizienten-Verhältnis in dem Sinne, daß die Konzentration der weniger geladenen Form auf Kosten der Konzentration der stärker geladenen Form zunimmt; d.h. die scheinbare Dissoziationskonstante K $\left(K = \frac{[Y]\,(H^{\oplus})}{[HY]}\right)$ (wobei [ ] Konzentration und ( ) Aktivität bedeutet) nimmt beim Übergang von Wasser in ein unpolares Lösungsmittel ab, wenn die Abspaltung des Protons mit einer Zunahme der Bruttoladung (Summe der Absolutwerte der Ladung von HY und Y) verbunden ist.

Beispiel[1]: Essigsäure $pK_{H_2O} = 4,70$, $pK_{90\%\ EtOH} = 7.10$

Aethylammonium $pK_{H_2O} = 10,82$, $pK_{90\%\ EtOH} = 9.78$

Ersetzt man bei der Titration eines Ampholyten das Wasser ganz oder teilweise durch ein weniger polares Medium, z.B. Alkohol, so wird das Existenzgebiet (pK_1 — pK_2) der isoelektrischen Form breiter, wenn es sich vorwiegend um ungeladene Teilchen handelt, und schmäler, wenn vorwie-

1) (siehe Cohn/Edsall S. 109)

gend Zwitterionen vorliegen.[1)]

Die Frage, ob N-(Z-L-Glutamyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin in der Neutralform vorwiegend als Zwitterion oder als ungeladenes Molekel vorliegt, läßt sich also qualitativ auf einfache Weise anhand von Vergleichtitrationen in Wasser und wässerigem Alkohol entscheiden. Dabei sind lediglich noch einige meßtechnische Fragen zu diskutieren:

1. Bestimmungen von Protolysekonstanten lassen sich in nicht-rein-wässerigem Milieu mit einer üblichen Laborausrüstung (Glas- und Kalomel-Elektrode) nicht als einwandfreie Absolutmessungen durchführen. Treten aber mehrere Dissoziationskonstanten bei derselben Molekel auf, so sind Messungen des Verhältnisses dieser Konstanten möglich.
2. Für ein nicht-wässeriges System darf nicht ohne weiteres eine lineare Beziehung zwischen Meßkettenspannung und Protonenaktivität angenommen werden. Bei Vergleichsmessungen in 75 % Alkohol dürften die möglichen Abweichungen aber zu vernachlässigen sein. Vorsichtshalber überprüft man an einigen Ampholyten bekannter Konstitution (z.B. Glycin, p-Aminobenzoesäure etc.).
3. Da es wie schon unter 1. erwähnt, nicht möglich ist, ohne besonderen Aufwand pK-Werte in nicht-rein-wässerigem Milieu exakt zu bestimmen, ist es sinnvoll, die pK-Werte (sowohl bei der Titration in Wasser als auch bei derjenigen in 75 % Aethanol) nur angenähert durch die direkt aus der Titrationskurve abgelesenen "Halbtitrations-pH-Wert-Differenzen" wiederzugeben. Der dadurch ins Endresultat ($\Delta pK_{EtOH} - \Delta pK_{H_2O}$) eingehende Fehler ist klein und sicher ohne Einfluß auf die gewünschte Aussage.

---

1) E.J. Cohn/J.T. Edsall, Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions, Reinhold Publ.Corp. New York 1943, S. 105-109.

Tabelle 4

Existenzbereiche ΔpK[1] der isoelektrischen Form von N-(Z-L-Glutamyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin und von Vergleichssubstanzen in Wasser und 75-proz. Alkohol.

Verbindung	ungefährer Existenzbereich in		Differenz d. Existenzbereiche	bevorzugte Konstitution der isoelektr. Form in wässeriger Lösung
	H_2O ΔpK_{H_2O}	75-% EtOH ΔpK_{EtOH}	($\Delta pK_{EtOH} - \Delta pK_{H_2O}$)	
Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH	2.70	1.50	-1.20	Zwitterion
BzO-Gly-hy-PheH[3]	2.50	3.9	+1.4	ungeladen
Glycin[3]	6.95	6.20	-0,75	Zwitterion[2]

Temperatur $25 \pm 1^{\circ}$

0.1mMol Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH.HCl in 8ml Wasser und 0.1mMol HCl

wurden mit 1N-NaOH titriert.

Einzelheiten über die Messungen siehe im experimentellen Teil dieser Arbeit.

1) Als Existenzbereich definieren wir das in pH-Einheiten gemessene Intervall pK_2-pK_1, in welchem ein gegebener Ampholyt mindestens zur Hälfte mit der Nettoladung Null vorliegt.

2) $\frac{\oplus NH_3CH_2COO^{\ominus}}{NH_2CH_2COOH} \sim 10^5$ vergl.: Cohn/Edsall, S. 99

3) R. Weber, W. Hofer, W. Heer, M. Brenner, Helv. 44, 2154 (1961)

Das Versuchsergebnis ist in Tab.4 dargestellt. (Die Tabelle enthält nebst den Daten von Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH auch einige der Literatur entnommene Daten; die Letzteren sind mit einer Zahl versehen). Die Lösungsmitteleffekte, welche in den Differenzen ($\Delta pK_{EtOH} - \Delta pK_{H_2O}$) zum Ausdruck kommen, sind beträchtlich und verhalten sich im Falle der Vergleichssubstanzen im Sinne der "Existenzbereichsregel". Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH verhält sich wie ein in

der Neutralform vorliegendes Zwitterion. Es kann also auch auf Grund dieses Befundes angenommen werden, daß in wässerigem Milieu Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH vorwiegend als Zwitterion vorliegt.

3. Autokatalyse bei der Umlagerung von Z-L-Glu(OH)-L-PheH (19)

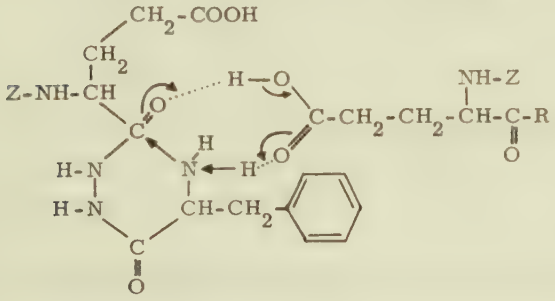
Mit der Existenz einer Carboxylgruppe im Molekül eines α-Aminodiacylhydrazins wie dies bei N-(Z-L-Glutamyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin der Fall ist, stellte sich die Frage, ob eine Autokatalyse möglich ist. In der Tat kann man, wie am Titel dieses Kapitels bereits angedeutet, (19) ohne Zugabe eines Katalysators in das isomere Z-L-Glu(OH)-L-Phe-hy umlagern.

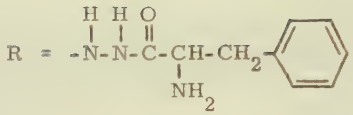
$$\text{Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH} \xrightarrow[40^{\circ}C]{\text{Dioxan}} \text{Z-L-Glu(OH)-L-Phe-hy}$$

Zwei Möglichkeiten der Interpretation für die katalytische Funktion der γ-Carboxylgruppe sind denkbar:

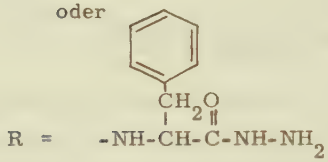
a) Es ist möglich, daß die γ-Carboxylgruppe durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung die gewünschte cis-Konformation stabilisiert.

b) Die Katalyse kann intermolekular erfolgen, wobei die γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure sowohl beim (19) als auch im Falle des durch Umlagerung entstandenen isomeren Z-L-Glu(OH)-L-Phe-hy als Katalysator wirken kann.



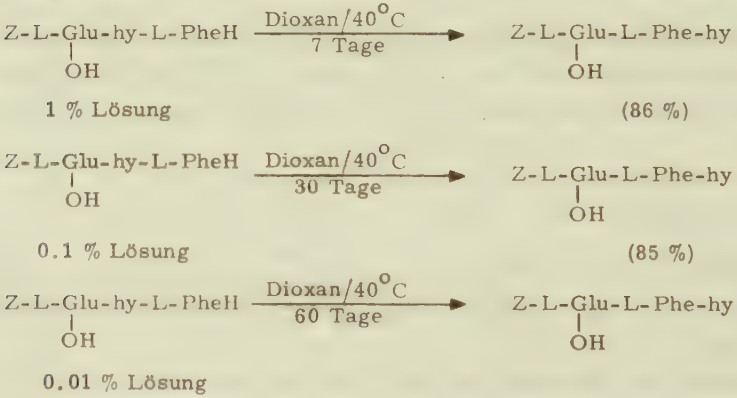


oder



Im Falle der intramolekularen Katalyse (a) ist die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Konzentration an Z-L-Glu-hy-L-PheH in der Lösung, im Gegensatz zur intermolekularen Katalyse (b), welche eine bimolekulare Reaktion erfordert.

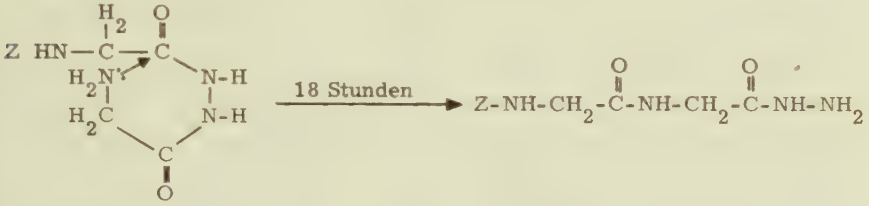
Die Frage nach der Art der Katalyse läßt sich also qualitativ auf einfache Weise anhand von Geschwindigkeitsvergleichen von Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Z-L-Glu-hy-L-PheH entscheiden. Dabei zeigt sich deutlich, daß die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des (19) abhängig ist.

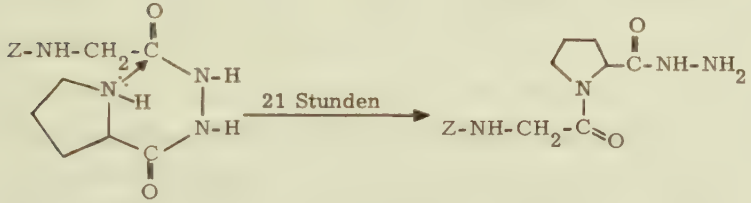


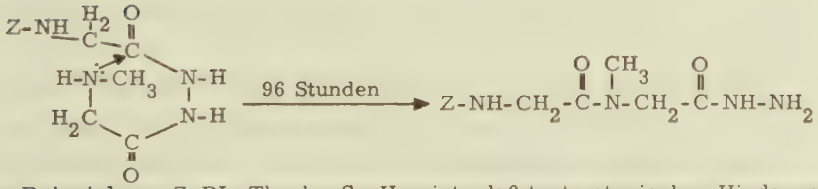
Dies bedeutet, daß die Katalyse nach einem intermolekularen Mechanismus verläuft.

IV. Variation an der aktiven Aminosäure

Es war von Interesse festzustellen, ob eine Substitution des Wasserstoffs an der angreifenden α-Aminogruppe die Reaktionsgeschwindigkeit der ADU beeinflußt. Ein Blick auf Tabelle 5 macht deutlich, daß die Einführung einer Methylgruppe die Umlagerungsgeschwindigkeit erheblich herabsetzt. Dies ist sicherlich auf die sterische Hinderung des nukleophilen Angriffs durch die Methylgruppe zurückzuführen. Diese Vermutung wird bestärkt durch die Tatsache, daß die ringgebundene Methylengruppe des Prolins die Umlagerungsgeschwindigkeit kaum beeinflußt.







Das Beispiel von Z-DL-Thr-hy-SarH zeigt, daß trotz sterischer Hinderung, sowohl am anzugreifenden Carbonyl wie auch am angreifenden Stickstoff, die Umlagerung noch möglich ist.

Tabelle 5

Verbindung	angreifende Aminogruppe	Reaktions-dauer in Std.	präpar. Ausbeute
Z-L-Pro-hy-GlyH	H_2N ——	20	68 %
Z-Gly-hy-GlyH	H_2N ——	18	o
Z-Gly-hy-SarH	$H_3C-\underset{H}{N}$ ——	96	*
Z-Gly-hy-L-ProH		21	83 %
Z-DL-Phe-hy-GlyH	H_2N ——	22	o
Z-DL-Phe-hy-SarH	$H_3C-\underset{H}{N}-$	96	*
Z-DL-Thr-hy-GlyH	H_2N ——	120	o
Z-DL-Thr-hy-SarH	$H_3C-\underset{H}{N}$ ——	220	*

o* Die Umlagerungen wurden auf dem DC bis zum Verschwinden des Ausgangsmaterials verfolgt. Die neu auftretenden Flecken zeigten Ninhydrin negative, Toluidin und Tollens positive Reaktionen. Die mit ^{o} markierten Verbindungen zeigten dünnschichtchromatographisch völlig identisches Verhalten mit den entsprechenden Vergleichsverbindungen. Für die mit * markierten Umlagerungshydrazide existierten keine Vergleichsverbindungen. Auf Grund ihres dünnschichtchromatographischen Verhaltens darf jedoch angenommen werden, daß es sich dabei um die erwarteten Hydrazide handelt.

V. Zur Praxis der Umlagerung

Im Verlaufe der Aminodiacylumlagerung können Nebenreaktionen auftreten, welche die Ausbeute an gewünschtem Umlagerungsprodukt herabsetzen und zudem eine Reinigung dieser Produkte erheblich erschweren. Somit ist es erforderlich, um diese Methode auch präparativ interessant zu machen, Versuchsbedingungen zu finden, die zu optimalen Ausbeuten führen. Die Reaktion muß möglichst einheitlich verlaufen und das Umlagerungsprodukt muß leicht aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden können.

1. Umlagerungsmedien

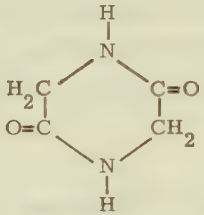
Wie früher erwähnt, erfolgt die Umlagerung mit hinreichender Geschwindigkeit in Medien wie Dioxan/Eisessig, DMF/Eisessig, Dioxan/Pivalinsäure und DMF/Pivalinsäure u.a.m. Vom praktischen Standpunkt aus ist von einem Umlagerungsmedium zu fordern, daß es ein gutes Lösungsvermögen besitzt, keinen Anlaß zu vermehrter Nebenproduktbildung bietet und eine leichte Isolierung des Endproduktes gewährleistet.

Leider ist keines der angegebenen Gemische in allen diesen Bedingungen optimal. Eisessig ist besser als Lösungsvermittler, aber stärker acylierend als Pivalinsäure. DMF hat ein größeres Lösungsvermögen, besitzt aber einen geringeren Dampfdruck als Dioxan. Ebenso ist Pivalinsäure schwerer flüchtig als Eisessig. Dies hat zur Folge, daß das bewährte Isolierungsverfahren im Fall der Verwendung von Dioxan/Eisessig (Lösungsmittelentfernung durch Gefriertrocknung) bei Verwendung von DMF/Pivalinsäure, ja selbst von Dioxan/Pivalinsäure versagt. Man kann zwar hier die Gefriertrocknung durch eine HV-Destillation teilweise ersetzen; letzte Spuren Lösungsmittel bleiben immer im Rückstand und wirken stark kristallisationshemmend auf das Endprodukt. Daraus ergibt sich als Arbeitsregel, daß man wo immer möglich in Dioxan/Eisessig arbeiten soll.

2. Nachweis von Glycindiketopiperazin als Nebenprodukt

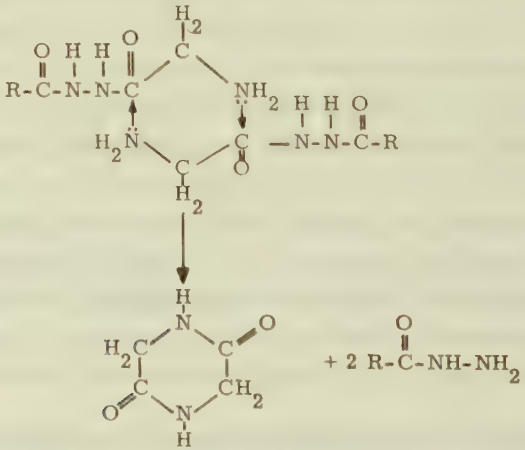
Nach sämtlichen Umlagerungen mit Glycin als aktiver Aminosäure enthielt das Reaktionsgemisch neben geringfügigen, nicht weiter untersuchten Ver-

unreinigungen ein dünnschichtchromatographisch intensiv in Erscheinung tretendes Nebenprodukt. Der betreffende Fleck war UV-, Ninhydrin- und Tollens-negativ, jedoch Chlor/Tolidin positiv. Die Substanz konnte demnach keinen aromatischen Rest, keine freie Amino- und keine Hydrazidgruppe tragen. Auf Grund dieser Befunde konnte es sich um Diketopiperazin handeln.



Ein sorgfältiger dünnschichtchromatographischer Vergleich hat diese Vermutung bestätigt (siehe Seite 147).
Es ist wahrscheinlich, daß das Diketopiperazin nach dem üblichen Reaktionsschema:

entsteht, im vorigen Fall also nach nachstehendem Formelbild:



In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, daß die Hydrazidgruppierung eine schwach aktivierende X-Gruppe darstellt (siehe Einleitung).

Das dabei erwartete, an sich bekannte N-Acyl-aminosäurehydrazid konnte nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Dies darf nicht erstaunen. Erstens ist es wesentlich einfacher Glycin-Diketopiperazin nachzuweisen, da dieses schon in sehr geringer Konzentration sehr stark Chlor/Tolidin positiv ist im Gegensatz zu N-Acyl-Aminosäurehydraziden. Zweitens finden sich auf dem DC im Bereich der N-Acyl-aminosäurehydrazide noch weitere Nebenflecken, die das Bild verwischen.

Die genannte Bildungsweise von Diketopiperazin erfordert eine bimolekulare Reaktion. Ihre Geschwindigkeit ist darum dem Quadrat der Konzentration proportional, im Unterschied zur monomolekularen Bildungsweise des Umlagerungsproduktes. Verkleinert man also die Konzentration, so müßte die Diketopiperazinbildung erschwert werden. Dies ist auch tatsächlich der Fall: Lagert man lg Aminodiacylhydrazin anstatt in 100ml Lösung in 200 ml Lösung um, so erkennt man auf dem DC eine starke Abnahme des Diketopiperazins und interessanterweise auch der andern Nebenflecken. Lagert man andererseits lg Aminodiacylhydrazin anstatt in 100 ml Lösung nur in 20 ml um, so treten sämtliche Nebenprodukte so stark in Erscheinung, daß es ohne Vergleichssubstanz sehr schwer wird, zwischen Haupt- und Nebenprodukten zu unterscheiden.

3. Isolierung der Umlagerungshydrazide als Hydrazone des Salicylaldehyds

Wie schon erwähnt wurde, kristallisieren die durch Umlagerung erhaltenen Hydrazide, bedingt durch Nebenprodukte und vor allem bei Umlagerungen in DMF, oft sehr schlecht. Es ist deshalb vorteilhaft, die entsprechenden Salicylhydrazone zu isolieren, da diese leicht in hohen Ausbeuten entstehen und vor allem sehr gut kristallisieren. Man gibt nach beendeter Umlagerung in die Lösung 1.1 Äquivalente Salicylaldehyd und läßt einige Stunden bei 40°C stehen, oder man destilliert nach beendeter Umlagerung das Lösungsmittel ab, nimmt den Rückstand in EtOH auf und versetzt dann mit dem Salicylaldehyd. Das Hydrazon kristallisiert meistens rasch fast quantitativ aus und ist sofort chromatographisch rein.

4. Diskussion der Ergebnisse

Für die hier untersuchten Umlagerungen waren optimale Versuchsbedingungen:

Für das Aminodiacylhydrazin eine 0.5% Lösung, als Katalysator diente 5 % (Volumenprozent) Eisessig und, sofern es die Löslichkeit der Aminodiacylhydrazine erlaubte, Dioxan als Lösungsmittel.

Da für meine Aufgabe eine weitere Kupplung der durch Umlagerung erhaltenen Hydrazide nicht nötig war, konnten mir als Endprodukte die gut kristallisierenden Salicylhydrazone ebenso willkommen sein. Es sei jedoch betont, daß in unserem Falle die Isolierung der Umlagerungsprodukte über die Hydrazone eine große Hilfe war, für die Aminodiacylumlagerung als Methode in der Peptidchemie dürfte sie jedoch ohne Bedeutung sein, besonders deswegen nicht, da noch keine milde Abspaltungsmethode für den Hydrazonrest bekannt ist.

Ausdrücklich sei nochmals erwähnt, daß die hier angegebenen Befunde nur für unsere Umlagerungsbeispiele gelten, bei denen das bewegliche Glycin als aktive Aminosäure eingesetzt war. Ersetzt man Glycin beispielsweise durch Phenylalanin, so konnte keine Diketopiperazinbildung beobachtet werden und die Kristallisationstendenz der erhaltenen Hydrazide ist merklich größer, so daß auch bei Umlagerung in DMF/AcOH auf die Isolierung über das Hydrazon verzichtet werden kann.

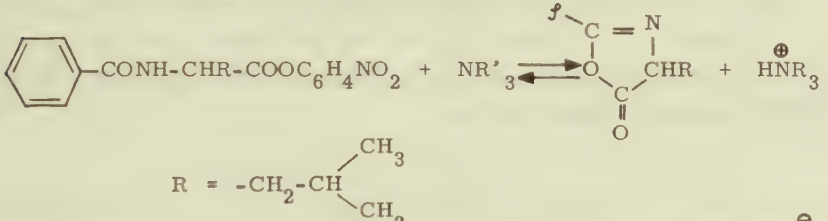
D. Studien zum Racemisierungsproblem: Die Erhaltung der Asymmetrie am optisch aktiven Zentrum der passiven Aminosäure

I. Allgemeines zur Racemisierung von Aminosäureresten

Die räumliche Anordnung der Substituenten am α-Kohlenstoffatom der optisch aktiven Aminosäurereste ist relativ labil und kann deshalb in eine spiegelbildliche Anordnung umklappen.

1. Oxazolon-Mechanismus

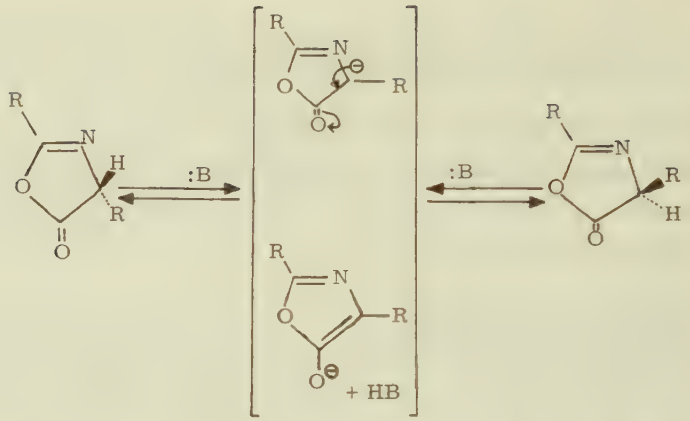
Wie Young[1] und Mitarbeiter zeigen konnten, verläuft die bei der Peptidsynthese häufig beobachtete Racemisierung oft über ein Oxazolon. Einen Beweis, daß die Bildung eines Oxazolons für die Racemisierung verantwortlich ist, hat Young beigebracht bei seinen Studien über die Kupplung von Benzoyl-L-Leucin-p-Nitrophenylester mit Glycinaethylester. Er fand in Modellversuchen, daß der genannte p-Nitrophenylester in basischem Milieu bis zur Einstellung eines Gleichgewichts in Oxazolon und Nitrophenolat übergeht:



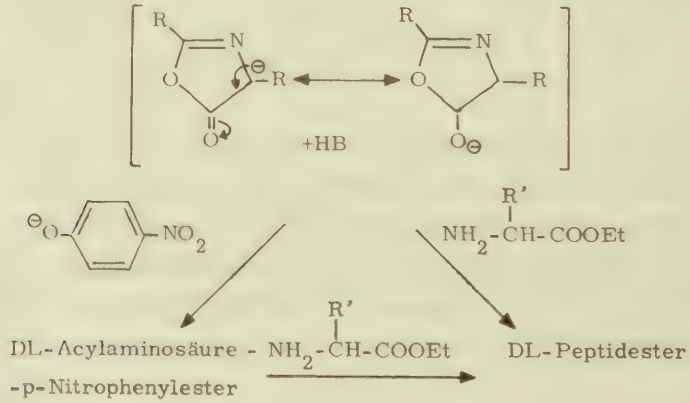
Das Auftreten des Oxazolons ist anhand des IR-Spektrums leicht verfolgbar. Solche Oxazolone geben in Gegenwart von Basen an der α-Stellung leicht ein Proton ab. Das entstehende Anion ist durch Resonanzenergie stabilisiert; bei der Ladungsverschiebung wird das α-Kohlenstoffatom trigonal und bei der Rückbildung der konjugaten Säure entsteht deshalb ein Stereoisomerengemisch.

---

1) W. Williams, G.T. Young, J.chem.Soc. 1964, 3701



Oxazolone heißen auch Azlaktone; dieser Name deutet darauf hin, daß sie sich gegenüber Nukleophilen wie Laktone verhalten. Der Ring wird leicht geöffnet. Mit Nitrophenolat bildet sich ein Acylaminosäureester, mit einem Aminosäureester ein Acyldipeptidester. Insofern als die Asymmetrie auf der Oxazolonstufe verloren ging, sind die gebildeten Produkte "racemisiert". Dieser Ausdruck wirkt immer dann unglücklich, wenn im Endprodukt noch andere Asymmetriezentren vorliegen, die durch die Oxazolonbildung nicht in Mitleidenschaft gezogen wurden.

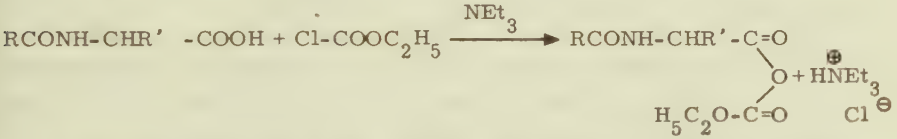


Erwähnenswert bleibt noch ein neulicher Befund aus der Weygand-Schule, wonach bei der Ringöffnung durch einen optisch aktiven Aminosäureester

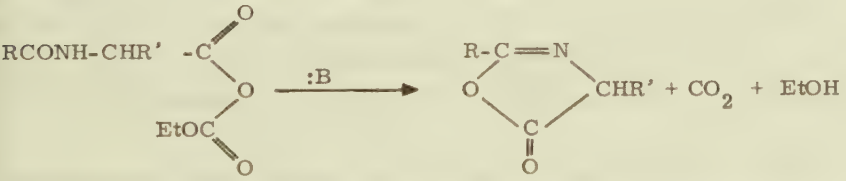
eine asymmetrische Induktion eintreten kann. Der Racemisierungsgrad des Produkts ist deshalb kein zuverlässiger Maßstab für den Racemisierungsgrad des Oxazolons.

Von erheblichem theoretischem und praktischem Interesse ist es, daß Lewis-Basen wie H_3C- -$SO_3^{\ominus}$, $Cl^{\ominus}$, $J^{\ominus}$ und sogar $ClO_4^{\ominus}$ in den Reaktionsmedien, wie sie für die Peptidkupplung verwendet werden, ebenfalls racemisierend wirken. Sie scheinen wie Triaethylamin oder selbst wie die zur Kupplung gebrauchte Aminokomponente die Oxazolonbildung durch Proton-Abstraktion vom Amidstickstoff der Acylkomponente R-CO-$\underset{H}{N}$-CHR'-COX einzuleiten. Es ist deshalb in der Praxis nicht gleichgültig, ob als Aminkomponente ein freier Aminosäureester oder aber dessen Hydrochlorid mit 1 Äquivalent tertiärer Base zur Kupplung gebracht wird.

Ähnliche Überlegungen machten auch Applewhite und Nelson[1] in Bezug auf den Racemisierungsmechanismus bei der Bildung und Verwendung der gemischten Anhydride von Acylaminosäuren mit Alkylkohlensäure.



Hier kann das Anion (Acyl-NH-$\underset{R'}{C}$H-$COO^{\ominus}$) als Base die Oxazolonbildung induzieren.



Die Autoren empfehlen deshalb von der üblichen Technik abzuweichen, d.h. den Chlorameisensäureester vorzulegen und das gemischte Anhydrid durch allmählichen Zusatz von Triaethylammoniumsalz der Aminosäure zu bilden.

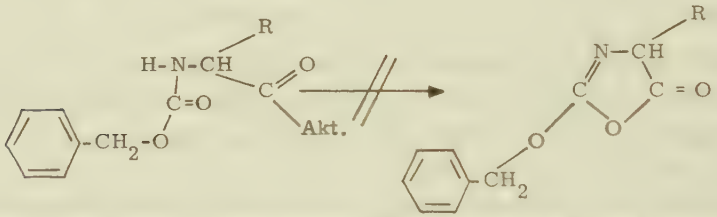
---

1) T.H.Applewhite, J.S. Nelson, Tetrahedron Letters 1964, 819

Auch Siemion und Nowak[1] haben aus den gemischten Anhydriden von Acetyl- und Benzoylaminosäuren optisch aktive Oxazolone hergestellt.

Nach Determann und Wieland[2] soll aber auch beim normalen Procedere die Racemisierung verhindert werden können, wenn man bei -15°C arbeitet und die Reaktionsdauer zur Bildung des Anhydrids auf 10 Minuten beschränkt.

Das sicherste Verfahren zur Racemisierungsvermeidung besteht allerdings darin, als Acylkomponenten ausschließlich Alkyloxycarbonylaminosäuren zu verwenden. Eine Ausnahme von dieser Regel machen nur das an sich symmetrische Glycin und die Proline, deren N-Acylverbindungen keinen ionisierbaren Wasserstoff besitzen. Bis heute ist theoretisch ungeklärt, aus welchem Grunde die Urethan-Gruppierung keine Oxazolonbildung zuläßt.



Die letzte und eigentlich entscheidende Voraussetzung für die Racemisierung durch Oxazolonbildung ist indessen die Natur der aktivierenden Gruppe X in der aktivierten Acylaminosäure RCO-NH-CHR-COX.

Man stellt fest, daß die Racemisierungsgefahr mit dem Aktivierungsgrad von $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-X$ d.h. mit dem elektronegativen Charakter von X zunimmt. Unglücklicherweise verlangt die Kinetik der Kupplungsreaktion nun vorzugsweise gerade solche X-Gruppen, welche racemisierungsgefährdend wirken. Diese Tatsache führt zum eigentlichen Zentralproblem der Peptidsynthese. Es lautet:

Wie kann man wirksam aktivieren, ohne gleichzeitig zu racemisieren?

Eine noch ungeklärte Ausnahme von der Regel bieten die Acylaminosäureazide. Erst in neuester Zeit ist gleichzeitig Anderson und Weygand gelungen,

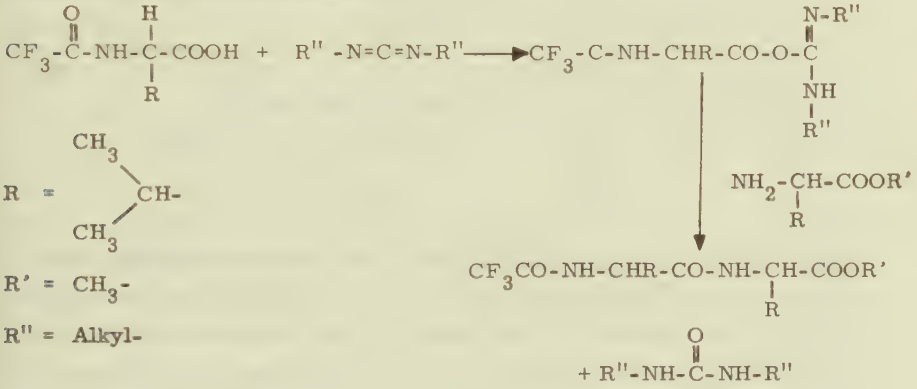
---

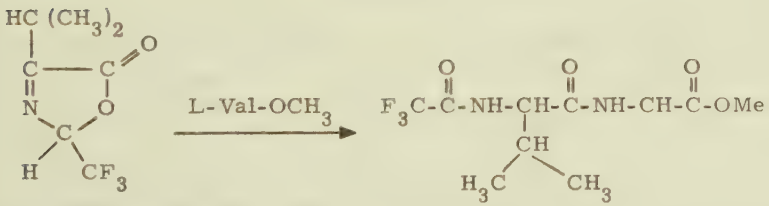
1) K. Nowak, J. Z. Siemion, Roczniki Chem. 36, 557 (1962)
2) H. Determann, T. Wieland, Ann. 670, 136 (1964)

Racemisierung bei Azidkupplung überhaupt nachzuweisen. Ist also die Azid-Methode auch als praktisch racemisierungssicher zu betrachten, so hat sie doch andere Nachteile. Das oben formulierte Zentralproblem bleibt daher bestehen.

Dieser Abriß über die Racemisierungsfrage wäre unvollständig, ohne Erwähnung der Racemisierung auf dem Weg über Pseudooxazolone. In einem Modellversuch, bei Kupplung von Trifluoracetyl-L-valin mit L-Valinmethylester nach dem Carbodiimidverfahren konnte Weygand[2] ein Pseudooxazolon nachweisen, das für die Racemisierung verantwortlich ist.

Reaktionsverlauf nach Khorana[1]





2-Trifluormethyl-4-isopropyl-pseudooxazolol-5-on

N-TFA-DL-Valyl-L-Valin-Methylester

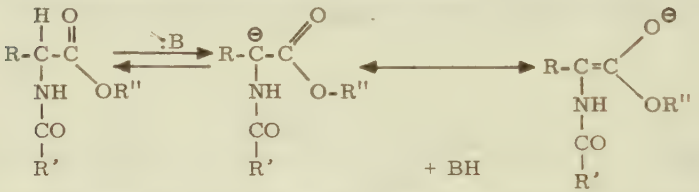
1) H.G. Khorana, Chem.Rev. 53, 145 (1953)

2) F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer, W. König, Angew.Chem. 75, 282 (1963)

2. Direkte basenkatalysierte Proton-Abspaltung

Mit dem Oxazolon-Mechanismus kann nicht erklärt werden, warum auch Benzyloxycarbonyl- und Phthaloyl-geschützte Aminosäurenderivate manchmal Racemisierung erleiden. Bodansky und Birkhimer[1] beobachteten beispielweise, daß p-Nitrophenylester vieler Benzoxycarbonyl- und Phthaloylaminosäuren in einer Lösung von Dimethylformamid, die Triaethylamin enthält, racemisieren.

In Gegenwart einer Base kann in gewissen Aminosäurederivaten leicht ein Proton vom α-Kohlenstoffatom abgespalten werden. Dabei entsteht ein Anion, welches, z.B. im nachstehenden Fall, mit der eben gebauten Ester-Enolatform in einem Mesomerieverhältnis steht.



Die Stabilität der α-C-H-Bindung hängt natürlich von den Substituenten R, R' und R'' ab. Sitzen also an der Amino bzw. Carboxylgruppe oder in den Seitenketten Gruppen mit einem minus I-Effekt, so kann die Ablösung des Protons vom α-Kohlenstoffatom erheblich erleichtert werden. Wenn sich nun wieder ein Proton an das Carbanion angelagert, so kann dies von der oberen oder von der unteren Seite erfolgen.

1) M. Bodansky, C. Birkhimer, Chimia 14, 368 (1960)

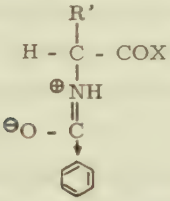
a) Einfluß der N-Acylierung

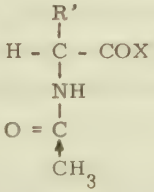
Bei der N-Acylierung von Aminosäuren oder deren Einbau in ein Peptid wird eine Amidbindung ausgebildet. Die Amidbindung kann betrachtet werden als Resonanzhybrid zwischen der normalen Amidform und der dipolaren Form.

X = aktivierende Gruppe

R = $-CH_3$, , etc...

Eine solche dipolare Form, in welcher sich eine partielle positive Ladung in direkter Nachbarschaft zum asymmetrischen Kohlenstoffatom befindet, begünstigt natürlich eine Ionisation am asymmetrischen Zentrum. So fand Neuberger[1)], daß Dipeptide und N-Acylaminosäuren in basischem Milieu weit schneller Racemisierung erleiden, als die entsprechenden Aminosäuren. Die Racemisierungsgeschwindigkeit wird dabei stark von der Natur der Acylkomponente beeinflußt. Beispielsweise wirkt der Benzoylrest stärker racemisierungsfördernd als der Acetylrest. Dies kann nicht erstaunen, hängt doch die Ausbildung der dipolaren Form der Amidbindung größtenteils von der Art des Acylrestes ab. Im vorliegenden Fall begünstigt der Phenylrest die Ausbildung der polaren Form der Amidbindung, während die Methylgruppe die gegenteilige Wirkung besitzt.

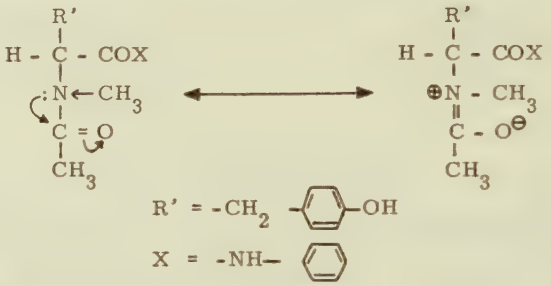




Vergleicht man die Racemisierungsgeschwindigkeiten von N-Acetyl-N-Methyl-Tyrosinanilid und N-Acetyl-Tyrosinanilid in basischem Milieu, so stellt man fest, daß in diesem Fall die Methylgruppe des Stickstoffs die Racemisierung begünstigt. Dieser Befund stellt keinesfalls einen Widerspruch des

1) A. Neuberger, Adv. in Prot.Chem. IV, 297 (1948)

oben Gesagten dar, fördert doch eine Methylgruppe, als +I-Substituent, die am Stickstoff sitzt, die Elektronenverschiebung in Richtung auf die Acylgruppe hin und begünstigt somit die Ausbildung der dipolaren Form.



b) Einfluß der Carbonyl-Alkyl- bzw. Arylierung

Es ist offensichtlich, daß bei einer freien Aminosäure (OR'' = OH) in basischem Milieu die Säure vorwiegend als Carboxylation vorliegt und deshalb als Elektronenacceptor nicht mehr in Frage kommt. Freie Aminosäuren erleiden auch in basischem Milieu kaum Racemisierung. Wird jedoch OR'' = OH durch eine Alkoxy- oder Aryloxygruppe ersetzt, so wird die Ester-Enolatbildung ermöglicht. Ein minus I-Effekt im Alkyl- oder Arylrest erleichtert dabei die Anionenbildung.

c) Einfluß der Seitenkette

Bodansky und Birkhimer[1] haben festgestellt, daß Benzyloxycarbonyl-S-benzyl-L-Cystein-p-nitrophenylester in Dimethylformamid bei Gegenwart von Triaethylamin extrem rasch racemisiert; zum gleichen Ergebnis gelangten auch Iselin und Schwyzer[2].

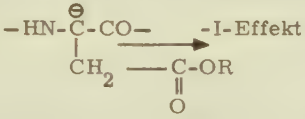
Swan[3] glaubt, daß eine β-Eliminierung der Benzylgruppe und eine anschließende Rückaddition stattfindet. Für diese Vorstellung spricht, daß neben racemischem Produkt noch Dibenzyldisulfid erhalten wird, das durch langsame Luftoxydation des entstandenen Thiols gebildet wird.

1) M. Bodansky, C. Birkhimer, Chimia 14, 368 (1960)

2) B. Iselin, M. Feurer, R. Schwyzer, Helv. 38, 1508 (1955)

3) J.A. MacLaren, W.E.Savige, J.M. Swan, Austral.J.Chem.11,345(1958)

Um den Einfluß der Substituenten R auf die Racemisierung noch deutlicher herauszuarbeiten, wählte Liberek[1] Aminosäurederivate, die kein Oxazolon bilden können, jedoch eine Gruppe mit starkem minus I-Effekt am β-Kohlenstoffatom tragen. Liberek untersuchte aktivierte Ester von Benzyloxycarbonyl-Cyano-L-alanin, Benzyloxycarbonyl geschützte β-Ester von L-Asparaginsäure und heterocyclische Aminosäuren. Es zeigte sich hierbei, daß in Gegenwart von Triaethylamin und sogar auch von Pyridin die p-Nitrophenylester dieser Benzyloxycarbonyl-Verbindungen sehr rasch racemisieren.



Liberek führt dies auf die Anionen-stabilisierende Wirkung der funktionellen Gruppe zurück.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß N-Schutzgruppen, Carboxyl-Aktivierung und β-Substituenten einen starken Einfluß auf die Anfälligkeit zur Racemisierung haben.[2] Der Ersatz einer solchen Gruppe durch eine andere, die Carbanionen besser stabilisieren kann, wird folglich die Racemisierung erhöhen, ein Ersatz durch eine schlechter Carbanionen-stabilisierende Gruppe wird die Racemisierung erniedrigen.

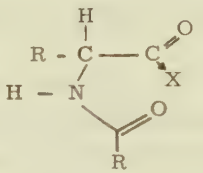
Es ist schwierig, während einer Kupplungsreaktion, bei der Oxazolonbildung möglich ist, abzuschätzen, welcher Betrag der Racemisierung auf die Oxazolonbildung und welcher auf die basenkatalysierte $H^{\oplus}$-Abspaltung zurückzuführen ist. Aktivierung der Carboxylgruppe erleichtert die Cyclisie-

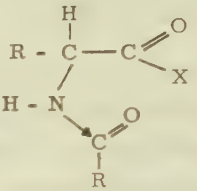
---

1) B. Liberek, Z. Grzonka, Tetrahedron Letters 1964, 159

2) Th. Wieland, H. Determann, Annalen 670, 136 (1964)

rung am Oxazolon, erhöht aber auch die Acidität des Wasserstoffs am asymmetrischen Zentrum.





Analog wird eine Aminoschutzgruppe, welche die Nucleophilie des Amid-Sauerstoffs erhöht, was die Oxazolonbildung fördert, gleichzeitig auch die Acidität des Wasserstoffatoms am Asymmetriezentrum erhöhen.

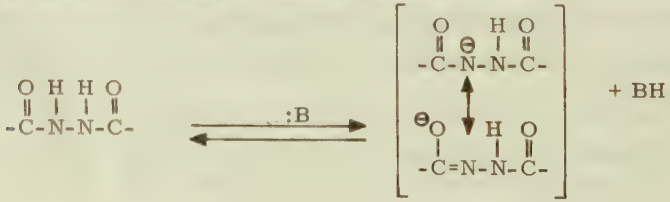
II. Potentielle Racemisierungs-Effekte bei der ADU

1. Die N-Schutzgruppe

In der vorliegenden Arbeit wurde als Acyl-Rest Benzyloxycarbonyl verwendet. Im Lichte der obigen Ausführungen verhindert dies Oxazolonbildung, schützt aber nicht vor Racemisierung nach einem andern Mechanismus.

2. Die Carboxyl-aktivierende Gruppe

Wie wir in Kap. A schon darlegten, führt der Ersatz von $-OCH_3$ in der zu kuppelnden Carboxylgruppe durch eine elektrophile Gruppe X zu "overactivation" und damit zu Racemisierung. Im Falle der ADU nun, stellt X eine schwach aktivierende Gruppe dar. Die Hydrazingruppe ist nicht Racemisierungs-begünstigend, denn sie ist weder ein Stabilisator für das entstehende Carbanion noch eine gute Abgangsgruppe im Falle der Oxazolonbildung. Ganz im Gegenteil! Die Hydrazingruppe gibt in basischem Milieu selber ein Proton ab, wobei kein Carbanion mit planarem α-Kohlenstoff sondern das folgende durch Mesomerie stabilisierte Anion entsteht:



Eine Racemisierung, verursacht durch die aktivierende Gruppe X, ist daher in unserem Falle nicht zu befürchten.

3. Die Seitenkette

Wie bereits erwähnt, wirken β-ständige funktionelle Gruppen mit minus I-Effekt Carbanion-stabilisierend. Entsprechende Aminosäuren sind somit im Vergleich mit den unsubstituierten Aminosäuren wie Gly, Ala, Val, Leu weit stärker racemisierungsfährdet. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns unter anderem mit dem Einfluß solcher Substituenten auf die ADU beschäftigt. Ist die Umlagerung tatsächlich mit Racemisierung am asymmetrischen Zentrum der passiven Aminosäure verbunden, so muß sie vor allem bei Aminosäuren wie Serin, Threonin etc. in Erscheinung treten.

4. Das Reaktions-Milieu

Wie Young gezeigt hat, können Lewis-Basen wie Cl^- die Racemisierungsgeschwindigkeit beeinflussen. Als Basen liegen in unserem Falle das Lösungsmittel selbst und in geringer Konzentration das Acetation $CH_3 - C(=O)-O^{\ominus}$ vor. Dioxan ist zu schwach basisch, um Racemisierung hervorrufen zu können; ob die geringe Konzentration an Acetat-Ionen eine Racemisierung bewirken kann, ist fraglich. Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß die Reaktionsdauer relativ lang ist und dies die Racemisierungswahrscheinlichkeit erhöht.

Da bekannt ist, daß unter milden Reaktionsbedingungen auch elektronegative, funktionelle Gruppen in der Seitenkette keine Racemisierungsgefahr darstellen, ist in unserem Fall auch von dieser Seite her eigentlich nichts zu befürchten. Eine Einschränkung in dieser optimistischen Beurteilung ist allenfalls auf Grund der langen Reaktionszeiten am Platze. Diese kommen in jedem Fall zur Geltung und ihre effektive Wirksamkeit läßt sich experimentell am besten an Modellsubstanzen prüfen, deren Asymmetriezentrum unter der kombinierten Wirkung von R, R', R'' und dem Milieu liegt. Diese Bedingung ist z.B. erfüllt bei der Umlagerung von Z-DL-Thr-hy-GlyH. Wir kommen unten darauf zurück.

III. Konventionelle Bestimmung des Racemisierungsgrades

Zur Zeit sind drei Modell-Systeme in Gebrauch, um die Racemisierungstendenz von Kupplungsreaktionen zu bestimmen:

1. Der Anderson-Test[1)]

Anderson benützt die Reaktion:

Z-Gly-L-Phe-X + Gly-OEt ⟶ Z-Gly-Phe-Gly-OEt + HX

X = aktivierende Gruppe

Aus einer 2-prozentigen Lösung der Kupplungsreaktion kann er Z-Gly-DL-Phe-Gly-OEt fraktioniert von Z-Gly-L-Phe-Gly-OEt kristallisieren und auf diese Art noch 1 % Racemat nachweisen.

2. Der Young-Test[2)]

Young verwendet folgende Reaktion:

BZ-L-Leu-X + Gly-OEt ⟶ Bz-Leu-Gly-OEt + HX

Der Grad der Racemisierung wird aus der optischen Drehung des bereits ohne Reinigung analytisch reinen Kupplungs-Rohproduktes erhalten. Noch 2 % Racemat kann nach der Verseifung des Esters durch fraktionierte Kristallisation isoliert werden. Die DL-Verbindung kristallisiert zuerst und rasch; in der Mutterlauge verbleibt das schlecht kristallisierende L-Dipepti

3. Der Weygand-Test[3)]

Weygand trennt im Gaschromatographen diastereoisomere Trifluoracetyldipeptid-methylester. Die Nachweisgrenze von DL in LL liegt bei einem Gehalt von 1 % DL.

TFA-L-Val-X + L-Val-OMe ⟶ TFA-Val-Val-OMe + HX

TFA-L-Leu-L-Phe-X + L-Val-OtBu ⟶ TFA-Leu-Phe-Val-OtBU ⟶ etc + HX

X = aktivierende Gruppe

1) G.W.Anderson, F.M. Callahan JACS 80, 2902 (1958)
G.W.Anderson, J.Blochinger, A.D. Welcker, JACS 74, 5309 (1952)
2) M.W. Williams, G.T. Young, J.Chem.Soc. 1963, 881
3) F.Weygand, A. Prox, L.Schmidhammer, W.König, Proc. 5th European Peptide Symposium, Oxford, 1962

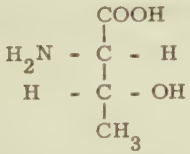
4. Anwendungsmöglichkeit bei der ADU

Bei der Aminodiacylhydrazinumlagerung haben wir als Endprodukt Hydrazide. Um eine der oben erwähnten Methoden anzuwenden, müßten wir die Hydrazide zuerst dehydrazidieren und anschließend die Acyldipeptide verestern. Bei beiden Reaktionsschritten müßte Gewähr bestehen, daß sie racemisierungsfrei verlaufen. Außerdem benützten die genannten Autoren in ihren Beispielen Aminosäuren, bei denen ziemlich sicher bei der Aminodiacylhydrazin-Umlagerung keine Racemisierung erwartet werden kann. Das Verfahren wäre also nicht nur fragwürdig und kompliziert, sondern vermutlich auch wenig sinnvoll. In einem ähnlichen Fall konnte U. Beglinger[1] auf einem direkten Wege zum Ziel gelangen. Er benützte als Racemisierungsindikator die Epimerisierung von Threoninderivaten. Das Prinzip und seine Anwendung auf die ADU wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

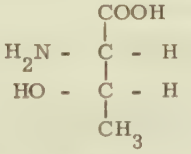
IV. Der Epimerisierungs-Test zur Bestimmung des Racemierungsgrades bei Einlagerungsreaktionen

1. Stereochemie bei Threonin und Allothreonin

Threonin bzw. Allothreonin enthalten zwei asymmetrische Zentren und werden in der Fischer-Projektion folgendermaßen dargestellt.



L-Threonin

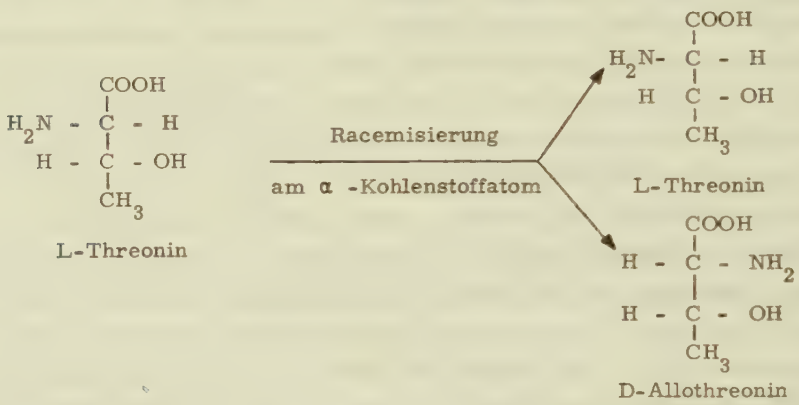


L-Allothreonin

Wird nun ein Threoninderivat Bedingungen unterworfen, welche die Asymmetrie am α-Kohlenstoffatom vorübergehend aufheben, so besteht die Möglichkeit, daß bei Wiederherstellung der Asymmetrie zwei verschiedene Anordnungen sich bilden. Da jedoch die Asymmetrie am β-Kohlenstoffatom

1) U. Beglinger, Dissertation, Universität Basel (1959)

erhalten bleibt, so stehen die beiden Produkte nicht im Verhältnis von Bild zu Spiegelbild. Sie sind nicht optische Antipoden sondern Epimere.



Aus einem L-Threoninderivat entsteht also ein Gemisch von L-Threoninderivat und D-Allothreoninderivat; entsprechend erhält man aus einem D-Threoninderivat ein Gemisch von D-Threonin- und L-Allothreoninderivat und analog gibt ein DL-Threoninderivat ein Gemisch von DL-Threonin- und DL-Allothreoninderivat. Ebenso verhält es sich mit racemischem Allothreoninderivat.

Threonin und Allothreonin haben verschiedene physikalische Eigenschaften; so lassen sie sich beispielsweise papierchromatographisch[1] voneinander trennen. Unten wird eine wirkungsvollere dünnschichtchromatographische Methode beschrieben.

2. Durchführung der Versuche

Zuerst versuchten wir Z-DL-Thr-Gly-hydrazid und Z-DL-Allothr-Gly-hydrazid auf DC in den verschiedensten Systemen voneinander zu trennen. Als dies erfolglos war, entschlossen wir uns, wie auf Seite 144 beschrieben, die isolierten Umlagerungsprodukte und Vergleichssubstanzen mit Salzsäure (1:1) zu hydrolisieren und die freien Aminosäuren auf DC zu trennen. Dabei mußten wir sicherstellen, daß:

1) T.L. Hardy, D.O. Holland, Chemistry and Industry 32, 517 (1954)

1. Die Ausgangsmaterialien und Vergleichssubstanzen diastereomerenfrei waren,
2. unter der gewählten Bedingung der sauren Hydrolyse keine Epimerisierung auftritt.

Ich verseifte daher die Umlagerungsausgangsmaterialien Z-DL-Thr-hy-GlyH bzw. die Allothr-Verbindung und die auf racemisierungsfreiem Wege synthetisierten Vergleichspräparate der Umlagerungsprodukte. In beiden Fällen fand ich diastereomerenfreies Threonin bzw. Allothreonin. Somit konnte ich annehmen, daß die "Aminodiacyle" (Z-DL-Thr-hy-GlyH bzw. Z-DL-Allothr-hy-GlyH) und die entsprechenden N-Acyldipeptidhydrazide rein waren und daß bei der sauren Hydrolyse keine Empimerisierung auftritt.

Wie wir im experimentellen Teil beschrieben haben, lassen sich noch gut 77 µg DL-Threonin von 1.1 µg DL-Allothreonin trennen und umgekehrt. Bei Anwendung dieser Technik auf das rohe Umlagerungsprodukt muß man also einen Racemisierungsgrad von 2.8 %, d.h. einen Epimerengehalt von 1.4 % sicher feststellen können.[1)]

Das Ergebnis der Versuche am Umlagerungsprodukt ist mit den Ergebnissen an den Modellsubstanzen zusammengefaßt und wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

3. Ergebnisse der Versuche

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Asymmetrie am α-Kohlenstoffatom von Threonin und Allothreonin bei deren Rolle als passive Aminosäuren während der Umlagerung erhalten bleibt. Die statistische Unsicherheit dieser Aussage ist kleiner als 1.4 %.

Wenn nun Threonin bzw. Allothreonin bei

a) einer extrem hohen Umlagerungszeit von 4 Tagen (nur übertroffen von Valin) und

b) einer funktionellen Gruppe mit minus I-Effekt in β-Stellung

1) In einem Gemisch von 50 % D und 50 % L ist der Racemisierungsgrad 100 %. Völlige (100 %) Racemisierung am α-C-Atom von L-Threonin ergibt ein Gemisch von 50 % L-Threonin und 50 % D-Allothreonin.

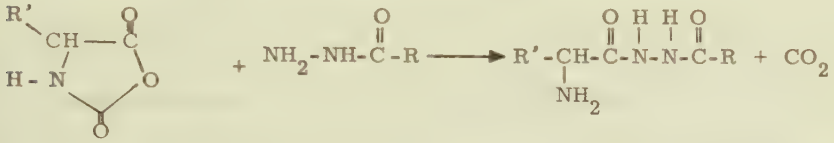
am Platz der passiven Aminosäure keine Racemisierung erleiden, so darf als praktisch sicher angenommen werden, daß entsprechende Umlagerungen auch in Bezug auf andere Aminosäuren unter den angegebenen Reaktionsbedingungen racemisierungsfrei verlaufen.

Experimentell ungeklärt bleibt die Racemisierungsresistenz am Platz der aktiven Aminosäure. Es ist indessen anzunehmen, daß jene Stelle weniger gefährdet ist, denn es fehlt der racemisierungsbegünstigende Einfluß eines Acylrestes am Aminostickstoff.

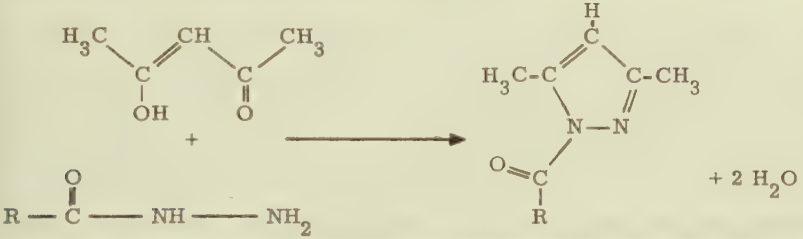
E. Pd-katalysierte Luftoxydation von Hydraziden

I. Die Polyvalenz der Hydrazidgruppe

Säurehydrazide besitzen bekanntlich mehrere Eigenschaften. Erstens stellen sie bei Carbonyl-Reaktionen wirkungsvolle Nukleophile dar, wie die Hydrazonbildung (Girard-Reagens) oder-in der vorliegenden Arbeit - ihre Verwendung zur Herstellung von Aminodiacylhydrazinen zeigt:



Ein weiteres Beispiel ist die Pyrazolid-Bildung aus Aminosäure- bzw. Peptidhydraziden und Acetylaceton nach Ried:[1)]



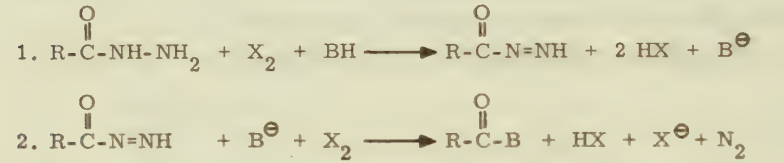
Zweitens sind Hydrazide Ausgangsstoffe von Säure-Aziden (Th. Curtius). Drittens - wenn man die Azid-Bildung nicht auch schon hierher nehmen will - sind Hydrazide leicht oxydierbar. Schon Th. Curtius[2)] erhielt durch Einwirkung von Jod auf ein Säurehydrazid das entsprechende Diacylhydrazin.

Weiter gelang es Carpino[3)], aus Säurehydraziden durch Oxydation der Hydrazidgruppe mit Chlor die entsprechenden Chloride herzustellen. Sackur[4)] konnte mit Hypobromit Säurehydrazide titrieren. In einem präparativ durch-

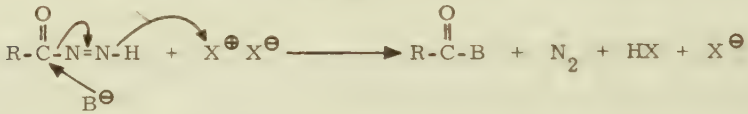
1) W. Ried, A. Czack, Ann. 642, 133 (1961)
2) Th. Curtius, J. Prakt. Chem. 50, 281 (1894)
3) C.A. Carpino, JACS, 79, 96 (1957)
4) M.E. Kahane, O. Sackur, Ann.pharm.frac. 11, 175 (1953)

geführten Versuch konnte W. Hofer[1] zeigen, daß es sich bei den dabei entstehenden Oxydationsprodukten um die entsprechenden Säuren handelt.

Diese Ergebnisse sind alle auf Grund des folgenden Reaktionsschema erklärbar:



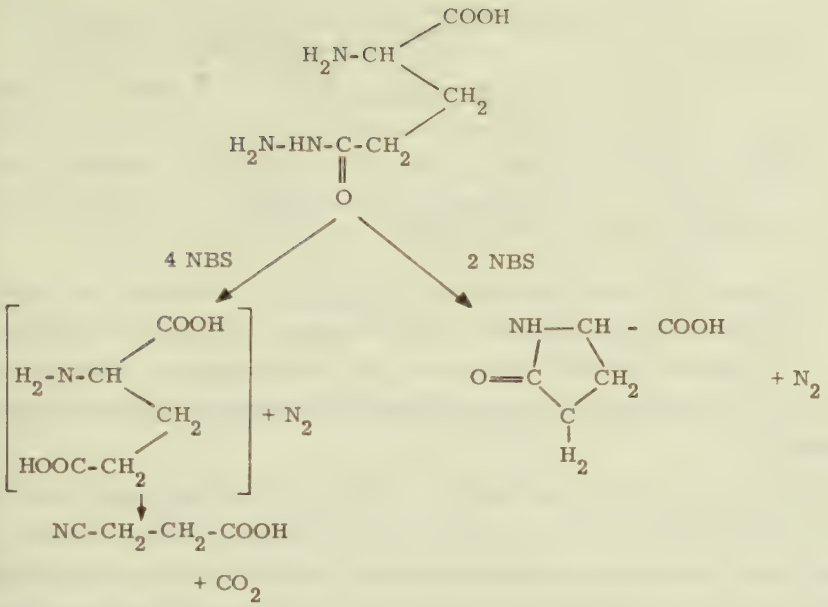
wobei für die Reaktion (2) folgender Mechanismus anzunehmen ist:



Eine besonders wirksames Reagens für eine solche Oxydation ist auch N-Bromsuccinimid (NBS). Patchornik[2] und Mitarbeiter konnten in wässrigem Dioxan Säurehydrazide durch NBS formal zu den entsprechenden Acylium-Ionen oxydieren, die dann mit den OH-Ionen des Wassers zu Säuren zusammentreten. Auf einen besonders interessanten Fall stießen sie bei der NBS-Behandlung des Glutaminsäure-γ-hydrazides.
Sie erhielten nicht die Glutaminsäure und das daraus durch Weiteroxydation erwartete Endprodukt β-Cyano-Propionsäure, sondern konnten in fast quantitativer Ausbeute Pyrrolidoncarbonsäure isolieren.

---

1) W. Hofer, Dissertation, Universität Basel(1962)
2) Y. Wolmann, P.M. Gallop, A. Patchornik, A. Berger, JACS 84, 1889 (1962)



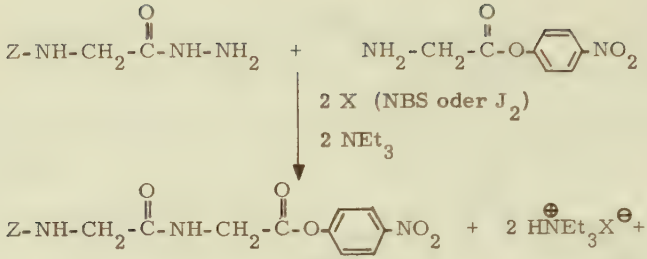
Von besonderem Interesse ist es, daß dieses aktivierte Zwischenprodukt in Gegenwart einer freien Aminogruppe gebildet werden kann. Überträgt man diese Reaktion nun auf N-geschützte Aminosäurehydrazide in Gegenwart von Aminosäuren bzw. -estern, so ist ein neuer Weg zur Herstellung von Peptiden gezeigt.

II. Oxydative Aktivierung von Säurehydraziden in der Peptidsynthese

In der Tat konnten Patchornik[1)] und Mitarbeiter auf diese Weise Peptide synthetisieren. Als Modellreaktion diente ihnen die Kupplung von Benzyloxycarbonylglycinhydrazid mit Glycin-p-Nitrophenylester.

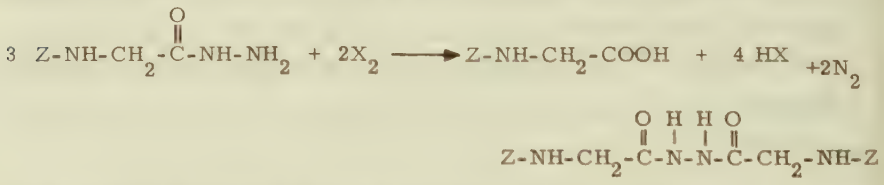
---

1) Y. Wolmann, P.M. Gallop, A. Patchornik, A. Berger JACS 83, 1283 (1963)
2) Y. Wolmann, P.M. Gallop, A. Patchornik, A. Berger JACS 84, 1889 (1962)



Als optimale Versuchsbedingungen hierfür geben sie an: 2 Mol NBS oder 2 Mol Jod als Oxydationsmittel, 1 Mol Benzyloxycarbonylglycinhydrazid, 1 Mol Glycin-p-Nitrophenylester und 2 Mol Triaethylamin in wässrigem Dioxan als Lösungsmittel. Schon nach 4-5 Minuten ist der Dipeptidester gebildet.

Hierbei ist es wichtig, daß das Hydrazid und die Aminkomponente gleichzeitig in der Lösung vorhanden sind. Wird nämlich das oxydierende Agens zuerst zum Benzyloxycarbonylglycinhydrazid gegeben und die Aminkomponente erst später, so wird kein Dipeptid erhalten, sondern nur Benzyloxycarbonylglycin und in geringer Ausbeute N,N'-Di(benzyloxycarbonylglycyl)-hydrazin.

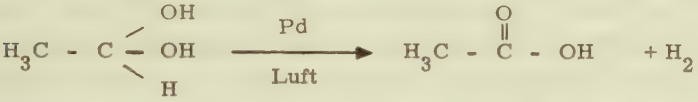


Die praktische Anwendung dieser Methode ist jedoch beschränkt. So sind oxydationsempfindliche Aminosäurereste wie S-Benzylcystein, Methionin, Tyrosin etc. auszuschließen, und vor allem stellt die Tatsache, daß der zweite Oxydationsschritt mit "overactivation" verbunden ist, ein großes handicap dar. In der Tat ist die Patchornik-Synthese racemisierungsanfällig.

III. Eine neue Möglichkeit zur oxydativen Aktivierung von Säurehydraziden

Schon H. Wieland[1)] hat anhand mehrerer Beispiele die katalytische Wirkung von Pd bei Oxydationen mit molekularem Sauerstoff aufgezeigt. So konnte er unter anderem durch bloßes Schütteln einer wässerigen Lösung von Hydrochinon mit Pd eine Oxydation zu Chinon erreichen.

Auf die gleiche Art oxydierte er Acetaldehyd(hydrat) zu Essigsäure.



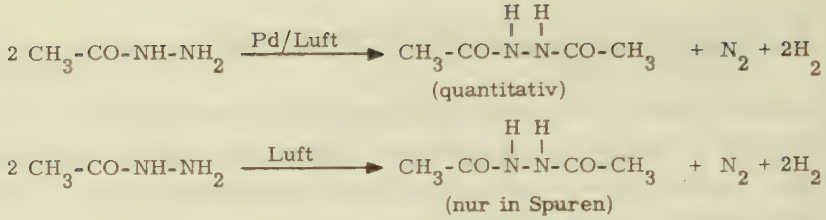
Wir stellten auch im Laufe unserer Versuche eine solche Wirkung fest. Gelang es uns doch nicht bei einem ADU-Experiment, das in Gegenwart von Pd ohne Luftabschluß durchgeführt wurde, das erwartete Hydrazid zu isolieren. Diese Zufallsbeobachtung veranlaßte uns zu einer genaueren Untersuchung des Phänomens.

1. Pd als Sauerstoffüberträger

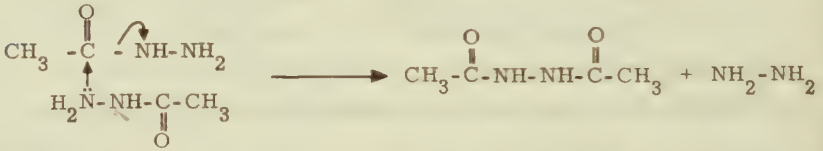
Als Modellsubstanz diente uns Acethydrazid . Aus einer Lösung von Acethydrazid in Dioxan/Eisessig, die während 30 Stunden in Gegenwart von Pd umgerührt worden war, konnte man fast quantitativ Diacetylhydrazin isolieren. Unter den gleichen Versuchsbedingungen, jedoch ohne Pd bildete sich, laut DC, Diacetylhydrazin nur in Spuren.

---

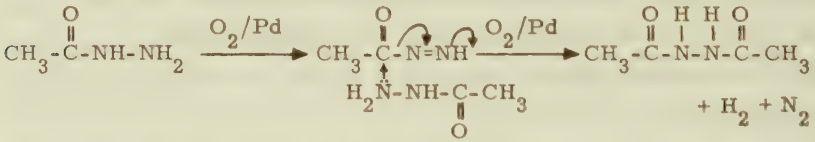
1) H. Wieland Ber. 45, 484 (1912)
45, 2606 (1912)
54, 2352 (1921)



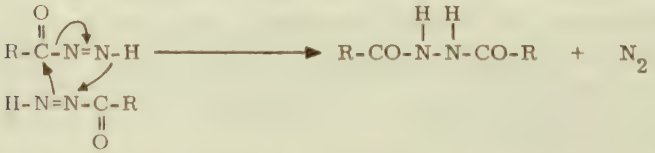
Eine Disproportionierungsreaktion kann ausgeschlossen werden, weil im DC kein Hydrazin auftritt.



Wir glauben daher, in Anlehnung an die Ausführungen im vorangehenden Abschnitt, daß das Hydrazid unter formaler Ausbildung eines Acyliumions oxydiert wird, das dann seinerseits unverändertes Hydrazid zum Diacetylhydrazin acyliert.[1)]



Nicht ganz ausgeschlossen ist eine Disproportionierung von zwei Molekülen Acyldiimin zu Stickstoff und Diacetylhydrazin.[2)]



Gegen diese Auffassung spricht allerdings die weitere Beobachtung, daß die Palladium-katalysierte Luftaktivierung der Hydrazide auch die Acylierung

1) Eine Theorie zur Oxydation, siehe H. Wieland Chem. Ber. 46, 3327 (1913)

2) Vergleiche dazu S. Hünig, H.R. Müller, W. Thier, Angew. Chem. 75, 298 (1963)

von andern Basen gestattet (siehe unten). Wenn die Annahme einer oxydativen Aktivierung zutrifft, so sollte unter Stickstoff- bzw. Wasserstoffatmosphäre keine Reaktion stattfinden. Dies ist auch tatsächlich der Fall.

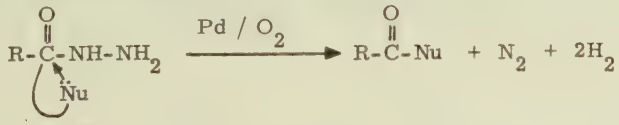
Pd scheint also als Sauerstoffüberträger zu fungieren. In der Tat bildet sich aus Acethydrazid in einer Lösung von Dioxan/Eisessig mit Pd, bei Hindurchleiten von O_2 schon nach 8 Stunden fast quantitativ Diacetylhydrazin; unter den gleichen Versuchsbedingungen, jedoch ohne Pd, erfolgt die Bildung von Diacetylhydrazin nach dieser Zeit, wie das DC zeigt, nur in Spuren.

Diese Ergebnisse legten es nun nahe, N-Acylhydrazide katalytisch zu oxydieren, und zwar in Gegenwart von Aminosäuren bzw. -estern, um auf diese Art zu Acylpeptiden zu gelangen. Dies scheint besonders deshalb von Interesse zu sein, als die Ausgangsmaterialien billig sind und die zu erwartenden, gasförmigen Nebenprodukte den Reaktionsablauf nicht stören sollten.

2. Anwendung in der Peptidsynthese

Wollen wir nun mit Hilfe der neuen Aktivierungsmethode Peptide herstellen, so befinden sich gleichzeitig in der Reaktionslösung: aktiviertes Hydrazid, entstanden durch Pd-katalysierte Oxydation, noch nicht angegriffenes Hydrazid und die zu acylierende Aminkomponente. Leider verläuft die Reaktion zum Acylamin nicht einheitlich. Es entsteht als hauptsächliches Nebenprodukt N,N'-Diacylhydrazin. So wurde beispielsweise aus äquivalenten Mengen Hippursäurehydrazid und Glycin (Na-Salz) in Wasser eine Mischung von Hippurylglycin und Dihippurylhydrazin im ungefähren Verhältnis (2:1) erhalten. Daraus konnte das Acyldipeptid in einer Ausbeute von 47 % isoliert werden. Die Methode ist also nicht interessant. Bei Gegenwart von oxydationsempfindlichen Aminosäureresten wie S-Benzylcysteinyl, Methionyl oder Tyrosyl ist sie überhaupt nicht anwendbar. Zudem ist mit Racemisierungsanfälligkeit zu rechnen.

Eine präparative Anwendungsmöglichkeit sehen wir eventuell bei intramolekularen Acylierungen (angreifendes Nukleophil in sterisch bevorzugter Lage), die zu Laktamen führen.



F. Zur Abspaltung des Hydrazidrestes

Die Hydrolyse eines Carbonsäurehydrazides zur freien Carbonsäure verläuft unter Bedingungen, bei denen Peptidbindungen gespalten werden. Es ist nicht möglich, in einem N-Acylaminosäure oder -peptidhydrazid durch saure- oder basenkatalysierte Hydrolyse den Hydrazidrest selektiv abzuspalten, ohne daß dabei nicht auch andere Bruchstücke entstehen.

I. Befunde von W. Hofer[1)]

Die von M.E. Kahane und O. Sackur[2)] beschriebene analytische Methode zur Bestimmung von Hydrazidresten konnte W. Hofer[1)] zur kinetischen Untersuchung bei der ADU benützen. Das Hydrazid wird dabei durch Hypobromit gemäß der Gleichung

$$R\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}NH\text{-}NH_2 + 2\ HOBr \xrightarrow{H_2SO_4} R\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}OH + N_2 + 2\ HBr + H_2O$$

zur Säure dehydrazidiert. Hofer benutzte diese Reaktion auch präparativ. Da Hypobromit aber ein relativ aggressives Reagens darstellt, war es fraglich, ob auch oxydationsempfindliche N-Acylpeptidhydrazide wie jene von Methionin, S-Benzyl-Cystein oder Tyrosin auf diese Weise dehydrazidiert werden können.

II. Oxydation des Schwefels bei Cystein- und Methioninderivaten

Bei Peptidsynthesen mit Methionin und S-Benzyl-Cystein treten oft Nebenreaktionen auf, welche durch die Thioäther-Funktion des Methionins bzw. S-Benzyl-Cysteins verursacht werden. Um diese Nebenreaktionen zu eliminieren (Fußnote folgende Seite), blockiert man temporär den Schwefel durch Oxydation zum Sulfoxyd[3)], das anschließend beispielsweise mit Glykolsäure reduziert wird. Als Oxydationsmittel wird Hydrogenperoxyd ver-

1) W. Hofer, Dissertation, Universität Basel (1962)
M. Brenner, W. Hofer, Helv. 44, 1794 (1961)
M. Brenner, W. Hofer, Helv. 47, 1625 (1964)
2) M.E. Kahane, O. Sackur, Ann.pharm.franc. 11, 175 (1953)
3) G. Toennies, J.J. Kolb, J.biol.Chemistry 140, 131 (1941)
G. Toennies, J. biol.Chemistry 145, 667 (1941)
B. Iselin, Helv. 44, 61 (1961)

wendet. Eine Weiteroxydation zu dem peptidsynthetische unerwünschten Sulfonderivat findet nur langsam statt und wird erst bei höherer Konzentration an Oxydationsmittel oder bei längerer Reaktionsdauer nachweisbar. Quantitativ wird die Sulfonverbindung nur unter katalytischer Mitwirkung von Ammoniummolybdat gebildet.

Im Hinblick auf diese leichte Oxydierbarkeit des Schwefels war nun zu befürchten, daß bei der Dehydrazidierung von Methionin- bzw. S-benzylcysteinhaltigen Peptidhydraziden mit Hypobromit Nebenreaktionen auftreten, die auf Oxydation des Schwefels beruhen. Dies ist auch tatsächlich der Fall.

Nebenreaktionen bei S-Benzylcysteinderivaten

So beschreibt Rudinger[1], daß er bei der Kupplung von Benzyloxycarbonyl-S-benzyl-L-cysteinylhydrazid und Glycinäthylester mit $NaNO_2$ und $HClO_4$ zum Teil Oxydation zum Benzyloxycarbonyl-S-benzy-L-cysteinylglycyl-OÄthylester beobachtet.

Weiter stellt die katalytische Decarbobenzoxylierung von S-Benzylcysteinderivaten immer noch ein ungelöstes Problem dar.

Nebenreaktionen bei Methioninderivaten

Die Abspaltung der Benzyloxycarbonylgruppe bei Methioninderivaten bereitet immer noch erhebliche Schwierigkeiten. Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig[2] oder mit alkoholischer Salzsäure[3] führt teilweise zur Bildung von S-Benzylhomocystein und die reduktive Decarbobenzoxylierung mittels Natrium in flüssigem Ammoniak[4] verursacht oft Demethylierung des Methionin-Schwefels.

Eine neuere Methode von K. Medzihradszky[5] konnte hier eine Verbesserung bringen; er führt die Hydrogenolyse nicht in saurem Milieu durch, sondern in

1) Rudinger, Col. Czech. Chem. Comm. 26, 2332, (1961)
2) St. Guttmann, R.A. Boissonas, Helv. 41, 1852 (1958)
3) C.A. Dekker, J.S. Fruton, J. biol. Chemistry 173, 471 (1948)
4) M. Brenner, R.W. Pfister, Helv. 34, 2085 (1951)
5) K. Medzihradszky, K. Medzihradszky-Schweizer 7th European Peptid Symposium, Budapest, 15 (1964)

Gegenwart von Cyclohexylamin oder Triaethylamin und konnte auf diese Art auch methioninhaltige Peptide katalytisch hydrieren. Allerdings versagt auch diese Methode, sofern das Methionin eine N-terminale Lage besitzt.

Es besteht keine experimentell deutlich feststellbare Selektivität im Angriff von Ätherschwefel und der Hydrazidgruppe. Die analytische Anwendbarkeit der Hydrazidoxydation legte die analytische Auswertung der entsprechenden Schwefeloxydation nahe. Es zeigte sich in der Tat, daß Derivate, die Methionin bzw. S-Benzylcystein enthalten mit Hypobromit titriert werden können.

G. Eine neue Möglichkeit zur Titration von Cystein- bzw. Methioninderivaten mit Hypobromit

Bei der Titration eines Methionin- bzw. S-Benzyl-Cysteinhydrazids mit Hypobromit werden nicht wie im Falle der andern N-Acylaminosäurehydrazide 2 Äquivalente Hypobromit verbraucht, sondern 3. Die Substanz wird gemäß der Gleichung

$$R\text{-}S\text{-}CH_2\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}NH\text{-}NH_2 \;+\; 3\,HOBr \xrightarrow{2N\text{-}H_2SO_4} R\text{-}\overset{\uparrow O}{S}\text{-}CH_2\text{-}COOH \;+\; N_2 \;+\; 3\,HBr \;+\; H_2O$$

oxydiert.

Somit war eine Möglichkeit aufgezeigt, Derivate von Methionin und S-Benzylcystein, die keine Hydrazidgruppe enthalten, wie beispielsweise Benzyloxycarbonyl-geschützte Dipeptidester, -Aminosäureester oder -Aminosäuren mit Hypobromit zu titrieren. Die entsprechende Reaktionsgleichung lautet:

$$R\text{-}S\text{-}CH_2\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}R' \;+\; HOBr \xrightarrow{2N\text{-}H_2SO_4} R\text{-}\overset{\uparrow O}{S}\text{-}CH_2\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}OR' \;+\; HBr$$

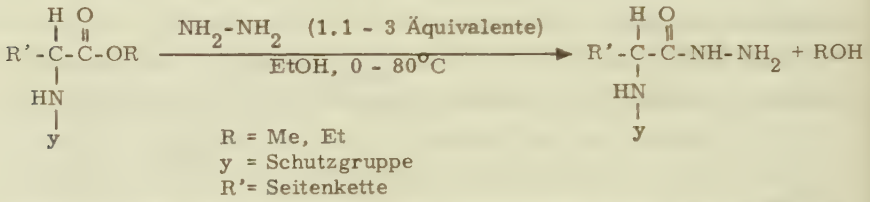
So konnte z.B. aus einer Lösung, die etwa gleiche Konzentrationen an Glycin, Alanin, Leucin und Methionin enthält, das Methionin mit einem Fehler von nur 0.7 % titriert werden.

Von Interesse war es nun festzustellen, ob diese Titrationsmöglichkeit für die Hydrazid- und die Thioätherfunktionen spezifisch ist. Aus diesem Grunde gab man zu der oben erwähnten Lösung jeweils noch eine entsprechende Menge Tyrosin bzw. Trypthophan. Dabei zeigte sich, daß der Hypobromitverbrauch größer wurde, jedoch konnten keine reproduzierbaren Werte erhalten werden. Ob allerdings durch eine Variation der Versuchsbedingungen auch Tyrosin- bzw. Trypthophanderivate mit Hypobromit titriert werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

H. Herstellung der Ausgangsmaterialien

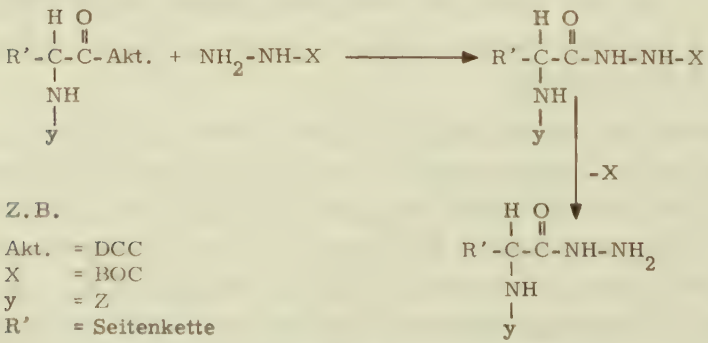
I. Hydrazide

N-geschützte Aminosäure- bzw. -Peptidhydrazide können auf zwei Wegen hergestellt werden. Einmal kann man den Aminosäure- bzw. Peptidester durch Umsetzen mit Hydrazin in das entsprechende Hydrazid überführen.

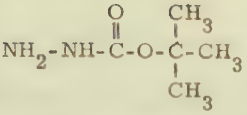


Praktisch sämtliche Hydrazide in der vorliegenden Arbeit und der größte Teil der in der Literatur beschriebenen wurden durch Hydrazinolyse der entsprechenden Ester hergestellt. Daher soll im folgenden Kapitel etwas ausführlicher über diese Reaktion berichtet werden.

Zum andern besteht die Möglichkeit, N-geschützte Aminosäuren bzw. -Peptide durch Aktivierung der Carboxylgruppe mit geschütztem Hydrazin umzusetzten und anschließend die Schutzgruppe am Hydrazinrest selektiv abzuspalten.



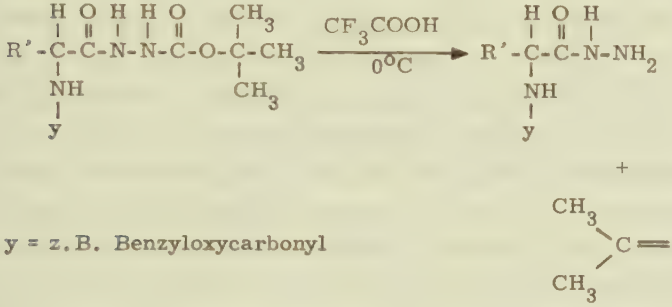
Selektivität der Abspaltung von X bedeutet Abspaltung unter milden Bedingungen, derart, daß andere labile Bindungen unangetastet bleiben. In dieser Hinsicht hat sich vor allem tertiär-Butyloxycarbonyl als Hydrazinschutzgruppe bewährt,



tertiär-Butyloxycarbonylhydrazin

BOC-Hydrazin

da sie sich bekanntlich leicht bei $0^{o}C$ in wasserfreier Trifluoressigsäure abspalten läßt.[1)]



y = z.B. Benzyloxycarbonyl

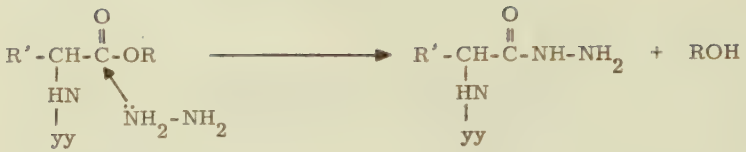
Die Wahl dieser indirekten Synthese ist zur Herstellung N-geschützter Aminosäure- bzw. -Peptidhydrazide, mit Hydrazin-empfindlichen Gruppierungen, unerläßlich. Wir kommen in Kap. 2 bei der Besprechung der Asparaginsäurehydrazide auf dieses Problem zurück.

1. Zur Hydrazinolyse von N-geschützten Aminosäure- bzw. Peptidestern

a) Allgemeine Bemerkungen

N-geschützte Aminosäure- bzw. Peptidhydrazide werden durch den nukleophilen Angriff von Hydrazin auf den entsprechenden Methyl- bzw. Ethylester gebildet. Diese Reaktion wird gewöhnlich in Alkohol mit einem Überschuß an Hydrazinhydrat durchgeführt und verläuft meist ohne besondere Komplikationen.

1) R. Schwyzer, W. Rittel, Helv. Chim. Act. 44, 159 (1961)
R. Schwyzer, H. Kappeler, Helv. Chim. Act. 44, 1991 (1961)

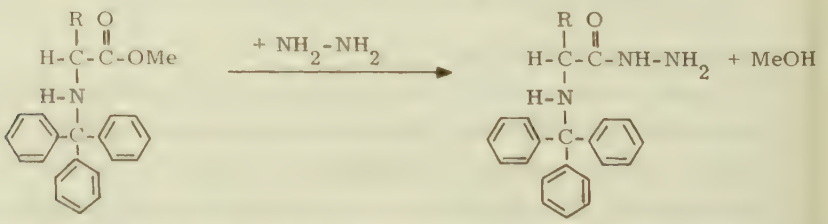


R' = Seitenkette
R = Me, -Et,
y = Schutzgruppe

Manchmal treten Schwierigkeiten auf, die sich indessen fast immer beheben lassen, ohne daß zum Mittel der geschützten Hydrazine gegriffen werden muß. Hierher gehören Reaktionshemmung durch sterische Hinderung, Racemisierung unter Beteiligung der funktionellen Gruppe in den Seitenketten, Hydrazinempfindlichkeit funktioneller Gruppen in den Seitenketten und mangelhafte Hydrazinrestistenz der Schutzgruppen. Sie werden im folgenden einzeln diskutiert. Zum Sonderfall der Asparaginsäure wird auf Kap. 2 verwiesen.

α) Sterische Hinderung

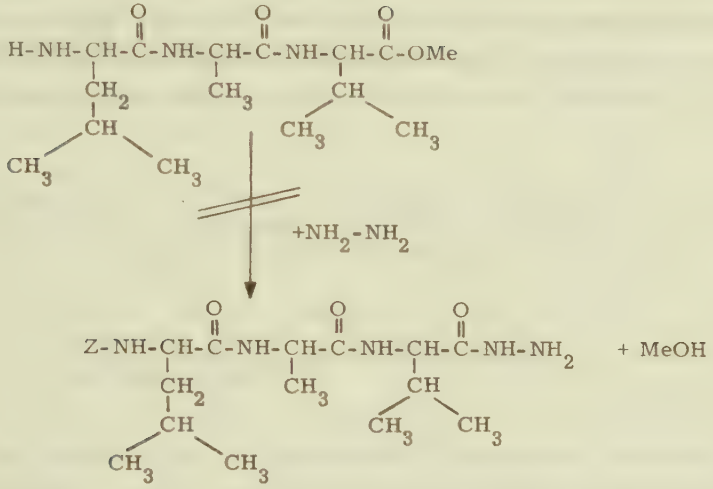
Wie erwähnt, reagieren sterisch gehinderte Ester nur schwer, in einigen Fällen sogar überhaupt nicht, mit Hydrazin. Beispielsweise kann man Tritylaminosäureester, mit Ausnahme von Tritylglycinmethylester, durch Hydrazinolyse nicht in die entsprechenden Hydrazide überführen. Hier hilft man sich durch die Wahl einer andern N-Schutzgruppe.



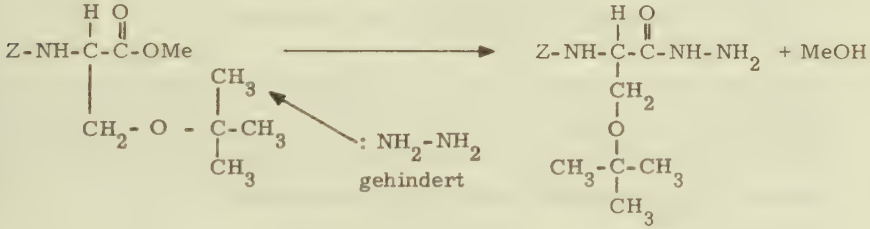
Ebenfalls sind sterische Gründe dafür verantwortlich, daß der Benzyloxycarbonyl-L-Leucin-L-Alanin-L-Valin-Methylester mit Hydrazin nicht zum erwarteten Hydrazid reagiert; selbst bei einer Reaktionszeit von einigen Tagen wird er unverändert aus dem Reaktionsgemisch isoliert.[1] Merkwürdigerweise tritt die Hinderung beim Benzylester so weit in den Hintergrund, daß

1) W.W. McGregor, F.M. Carpenter, J.org. Chem. 26, 1849 (1961)

die Reaktion präparativ möglich wird.



Im Falle von N-Benzyloxycarbonyl-Otert.-Butyl-L-Serinmethylester behindert die voluminöse tert. Butylgruppe den nucleophilen Angriff von Hydrazin, sodaß das erwartete Hydrazid nur in geringer Ausbeute erhalten wird.[1)]



(Ausbeute 26 %)

Unter solchen Umständen ist man dann gezwungen drastischere Maßnahmen (höhere Temperatur, größerer Überschuß an Hydrazin) anzuwenden, was gerade bei längeren Peptidketten zur Spaltung[2)] von Amidbindungen führen kann.

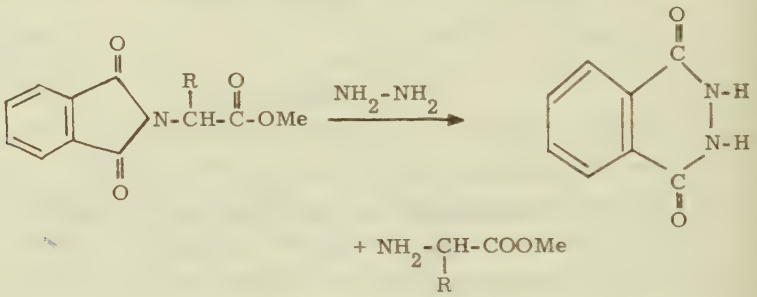
---

1) F.M. Callahan, G.W. Anderson, R. Paul, J.E. Zimmermann, JACS 85, 201 (1963)

2) S. Akabori, Bull. Chem. Soc. Japan, 25, 214 (1952)

β) Schutzgruppen

Phtalylaminosäureester oder -peptidester können nicht in die entsprechenden Hydrazide überführt werden, da die Hydrazinolyse der Phtalylgruppe zum Phtalylhydrazid wesentlich schneller verläuft als jene der Ester-Gruppe.[1]



Bekanntlich lassen sich N-Trifluoracetyl (TFA)-aminosäuren im Gegensatz zu den entsprechenden Acetyl-Verbindungen durch Basen leicht verseifen.[2]

$$F_3C\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-NH-CHR-COOH} \xrightarrow[1\ \text{Std.}\ /ZT]{\text{O.Oln NaOH}} H_2N\text{-CHR-COOH} + F_3C\text{-}COO^{\ominus}Na^{\oplus}$$

$$H_3C\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-NH-CHR-COOH} \xrightarrow[24\ \text{Std.}\ /ZT]{\text{O.Oln NaOH}} \text{unverändert}$$

Setzt man also N-TFA-Aminosäuremethylester mit wasserfreiem Hydrazin in Methanol um, so erhält man neben den TFA-Aminosäurehydraziden (70 %) auch die freien Aminosäurehydrazide, die indessen mit Hilfe eines schwach sauren Ionenaustauschers abgetrennt werden können.

$$2F_3C\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-NH-CHR-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-OMe} \xrightarrow{NH_2NH_2} F_3C\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-NH-CHR-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-NH-NH}_2 + \text{MeOH}$$

(70 %)

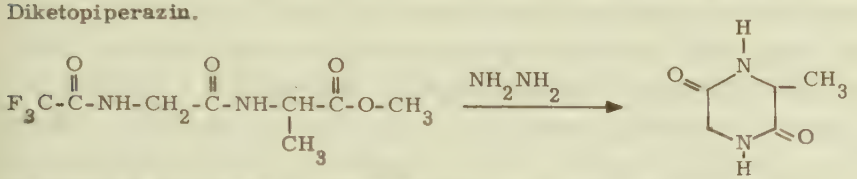
$$+ H_2N\text{-CHR-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-NH-NH}_2 + \text{MeOH}$$

(30 %)

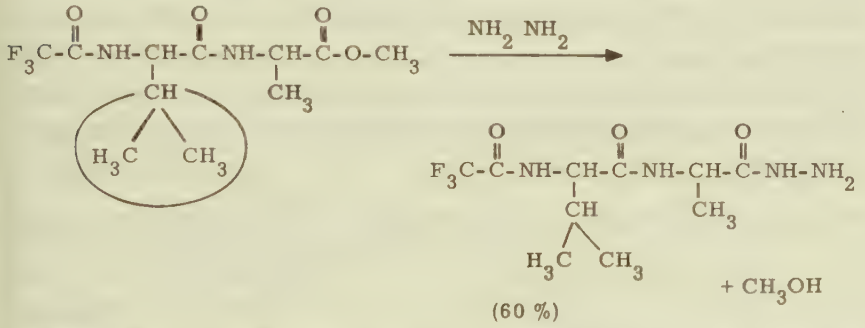
$$+ F_3COO^{\ominus}Na^{\oplus}$$

1) J.C. Sheehan, V.S. Frank, JACS 71, 1856 (1949)
2) F. Weygand, E. Csendes, Angew. Chem. 64, 136 (1952)
F. Weygand, E. Leising, Chem. Ber. 87, 248 (1954)
F. Weygand, M. Reiher, Chem. Ber. 88, 26 (1955)

Die N-TFA-Dipeptidester von Leucyl-L-prolin, L-Prolyl-L-Leucin oder Glycyl-L-alanin geben mit wasserfreiem Hydrazin die entsprechenden Diketopiperazine. Dies bedeutet, daß der TFA-Rest zuerst abgespalten wird. Die gebildeten Dipeptidester kondensieren dann in der üblichen Weise zum Diketopiperazin.



Lediglich N-TFA-Valyl-L-alanin-methylester konnte mit wasserfreiem Hydrazin in das entsprechende Hydrazid überführt werden.[1)]

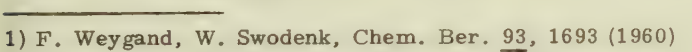


(60 %)

In diesem Falle geht die hydrazinolyse der Estergruppe schneller vor sich als diejenige der $F_3C-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-NH-$Gruppierung, und zwar infolge der sterischen Hinderung durch die Isopropylgruppe des Valylrestes.

γ) Funktionalität der Seitenkette

Beim Umsatz von Benzylocycarbonyl-L-Serinmethylester mit einem geringen Überschuß an Hydrazin in Alkohol bei 50°C, konnten Zahn und Schnabel[2)] nur racemisches Produkt erhalten.



1) F. Weygand, W. Swodenk, Chem. Ber. 93, 1693 (1960)
2) E. Schnabel, H. Zahn, Ann. 614, 142 (1958)

Ebenso war die Umsetzung von Benzyloxycarbonyl-L-Serien-Glycinmethylester mit Hydrazin in Alkohol von Racemisierung begleitet.

$$\text{Z-L-Ser-Gly-OMe} \xrightarrow{NH_2NH_2} \text{Z-DL-Ser-Gly-hy} + \text{MeOH}$$

Schwierigkeiten bereitet auch die S-Benzyl-Gruppe bei der Hydrazinolyse von N-geschützten S-Benzylcystein-peptidestern. So berichtet Swan[1], daß N-Benzyloxycarbonyl-S-benzyl-cystein-glycinethylester nach fünfstündigem Kochen am Rückfluß in Alkohol mit 1.5 Äquivalent Hydrazinhydrat als Hauptprodukt nicht das erwartete Hydrazid, sondern Dibenzyldisulfid liefert (vergleiche auch Versuch (8b)).

Bei Reduktion der Temperatur auf 50°C wird das erwartete Hydrazid zwar erhalten; die Reaktion ist indessen von Racemisierung begleitet (vergleiche Seite 49).

Eine Verminderung der Racemisierungsgeschwindigkeit kann schon durch eine Verwendung von n-Butanol anstelle von Ethanol als Lösungsmittel erzielt werden:

$$\text{N-Z-S-Bz-L-Cys-Gly-OEt} + NH_2\text{-}NH_2 \cdot H_2O \xrightarrow{\text{EtOH}} \text{10 \% DL-Verbind.}$$

$$\xrightarrow{\text{n-BuOH}} < \text{10 \% DL-Verbindung}$$

Die Racemisierung wird aber auch bei Verwendung von n-Butanol als Lösungsmittel und bei einer Reaktionstemperatur von 0°C nicht völlig unterbunden.

Bekannt ist schließlich, daß die Guanido-Gruppe des Arginins oft Anlaß zu Nebenreaktionen gibt. Die häufig angewandte Blockierung der ω-Guanidofunktion durch Nitrierung stellt bei Gegenwart von Hydrazin keinen Schutz dar.[2]

Es ist deshalb bis heute die Herstellung von Benzyloxycarbonylnitroarginin-hydrazid nicht gelungen; Arginylpeptide pflegt man nicht nach der Azidmethode zu synthetisieren.

---

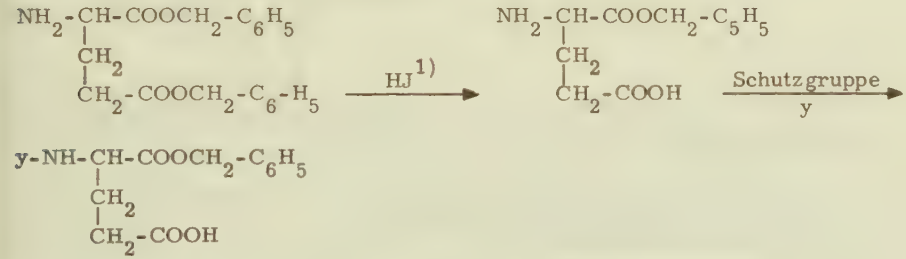
1) J.A. Maclaren, W.E. Savige, J.M. Swan Austr.J.Chem. 11, 345 (1948)
2) A.F. McKay, Chem.Rev. 51, 301 (1952)

δ) Glutaminsäure

Die Einführung des Hydrazidrestes in das α-Carboxyl N-geschützter Aminodiacarbonsäuren wirft wegen der Nachbarschaft der zweiten Carboxylgruppe im Molekül, sowohl bei Glutaminsäure als auch bei Asparaginsäure, besondere Probleme auf. Zur Gewinnung eindeutiger Produkte sind Reaktionsbedingungen zu schaffen, welche die jeweilige ω-ständige COOH-Gruppe unangetastet lassen. Während man bei der Glutaminsäure noch auf dem Weg der Hydrazinolyse zum Ziel gelangt, ist bei der Asparaginsäure ein anderer Weg erforderlich.

Im Falle der Glutaminsäure führt das Problem zunächst also dahin, α-Ester herzustellen, die von Hydrazin gut angegriffen werden, während die γ-Stellung, sei es in Form des freien Carboxyls, eines Esters oder des Amids, gegen den nukleophilen Angriff des Hydrazins resistent bleibt. Die Herstellung solcher Ester ist bisher auf mancherlei Art gelungen. Die Vielzahl der Möglichkeiten kann jedoch in die folgenden Reaktionsschemata (α', β', γ') eingeordnet werden.

α') Partielle Hydrolyse der Diester



β') Umsatz des Monosalzes mit Alkylhalogeniden

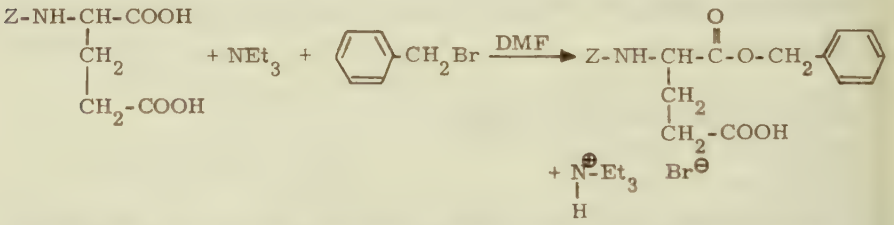
Gibt man zu einer N-Acyl-Glutaminsäure 1 Mol einer Base (B), z.B. Triaethylamin, so stellt sich zwischen den Formen 1 und 2 ein Gleichgewicht ein.

---

1) H. Sachs, E. Brand, JACS 75, 4610 (1953)

1 2

Das Verhältnis der Konzentrationen an 1 und 2 wird durch die unterschiedlichen pK-Werte der α- und der γ-Carboxylgruppe bestimmt. Diese pK-Werte und die Nucleophilie der entstandenen Anionen hängen stark von der Natur der Schutzgruppe und vom Lösungsmittel ab. Man erhält aus einer äquimolaren Lösung von Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminsäure und Triaethylamin in DMF durch Zugabe von 1.1. Äquivalenten Benzylbromid, N-Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminsäure-α-Benzylester mit über 70 % Ausbeute.[1)]



Anstelle von Benzylbromid kann auch Methylbromid oder Dimethylsulfat verwendet werden.

γ') Ringöffnung von N-Acyl-Glutaminsäure-anhydrid durch Nukleophile ⊗

N-Acylglutaminsäureanhydride setzen sich mit Alkohol zu den entsprechenden N-Acylglutaminsäureestern um. Dabei hängt der Anteil an α-bzw. γ-Ester vor allem von der Natur der Aminoschutzgruppe ab.

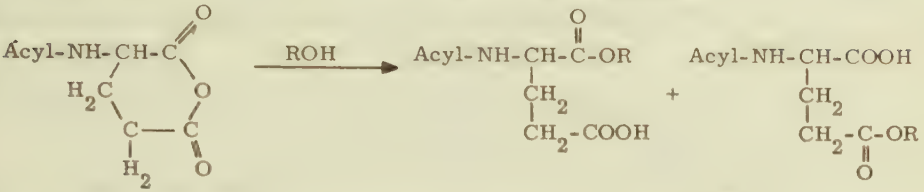
⊗ siehe Seite 77 unten !

---

1)

G.H.L.Nefkens, R.J.F. Nivard, Rec.Chim.des Pays-Bas 83, 199 (1964)

Die resultierenden Gemische sind jedoch schwierig trennbar.[1)]



Eine elegante Methode dieses Problem zu lösen, fand Weygand[2)], indem er die Monoäthylester in Form des Dicyclohexylammonium-Salzes fraktioniert kristallisieren konnte. Gibian[3)] erhielt durch Umsatz von Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminsäureanhydrid mit Äthylmercaptan ein Gemisch der Mercaptoester, die er ebenfalls über die Dicyclohexylammonium-Salze gut trennen konnte.

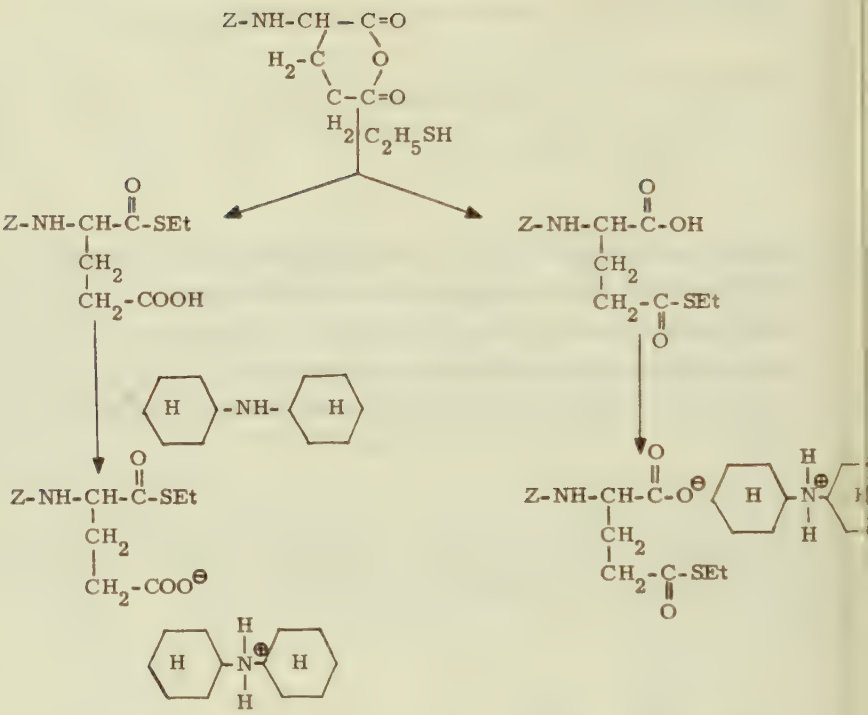
---

1) W.J. LeQuesne, G.T. Young, J.Chem.Soc. 1950, 1954
2) F. Weygand, K. Hunger, Z. für Naturforschung 13b, 50 (1958)
   F. Weygand, K. Hunger, Chem. Ber. 95, 7 (1962)
3) H. Gibian, E. Klieger, Ann. 651, 194 (1962)

Ⓧ Es ist bekannt, daß N-Acyl-Glutaminsäureanhydride sich direkt mit Aminosäureestern zu N-Acyl-Peptidestern umsetzen. Dabei hängt der Anteil an α-bzw. γ-Ester größtenteils von der Aminoschutzgruppe ab. So liefern Benzyloxycarbonyl-[1)] und Trifluoracetylglutaminsäureanhydrid[2)] bei Umsatz mit Aminosäureestern vorwiegend α-Derivate, während Phtalyl-Glutaminsäureanhydrid[3)] überwiegend die γ-Verbindung ergibt.
Ein analoger Umsatz von N-Acylglutaminsäureanhydrid mit Hydrazin führt, wie Young[4)] gezeigt hat, zu Gemischen, die nicht trennbar sind.

---

1) M. Bergmann, L. Zervas, J.S. Fruton, J.biol.Chem. 111, 225 (1935)
2) F. Weygand, E. Leising, Chem.Ber. 87, 248 (1954)
3) F.E. King, D.A.A.Kidd, J.Chem.Soc. 1949, 3315
4) W.J. LeQuesne, G.T. Young, J.Chem.Soc. 1950, 1954



kristallin
(70 %)

bleibt in Lösung
(30 %)

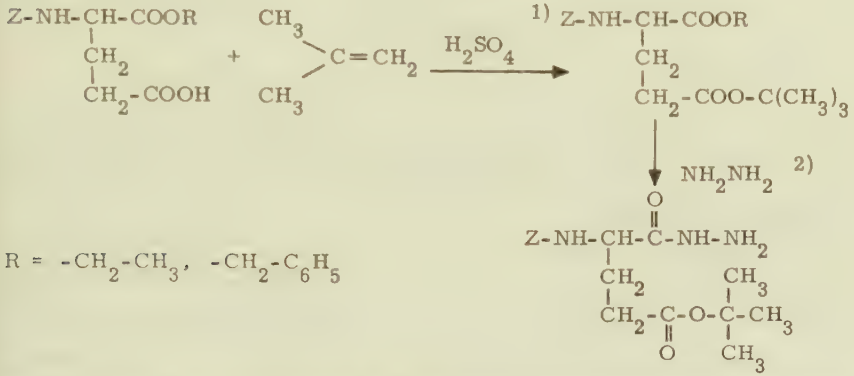
Dieser Thioester kann vorteilhaft in Glutamylpeptid-Synthesen oder zur Herstellung des α-Hydrazids eingesetzt werden, da die α-Thioester-Gruppierung einmal als Schutzgruppe, zum andern Mal als aktivierende Gruppe fungieren kann. Er ist auch insofern besonders günstig, als er sich leicht mit Diazomethan zum Diester umsetzt, aus welchem ohne weiteres das α-Hydrazid erhalten werden kann (siehe Seite 80).

N-Acyl-L-Glutamin-Methylester lassen sich leicht mit ca. 72 % Ausbeute aus Benzyloxycarbonyl-L-Glutamin durch Umsatz mit Diazomethan in Alkohol herstellen.[1)]

1) E. Sondheimer, R.W. Holley, JACS 76, 2467 (1954)

Aus dem nach α', β' und γ' erhaltenen Estern und Aminoacylglutaminestern erhält man die gewünschten Hydrazide auf folgenden Wegen:

aus α-Alkoxyester

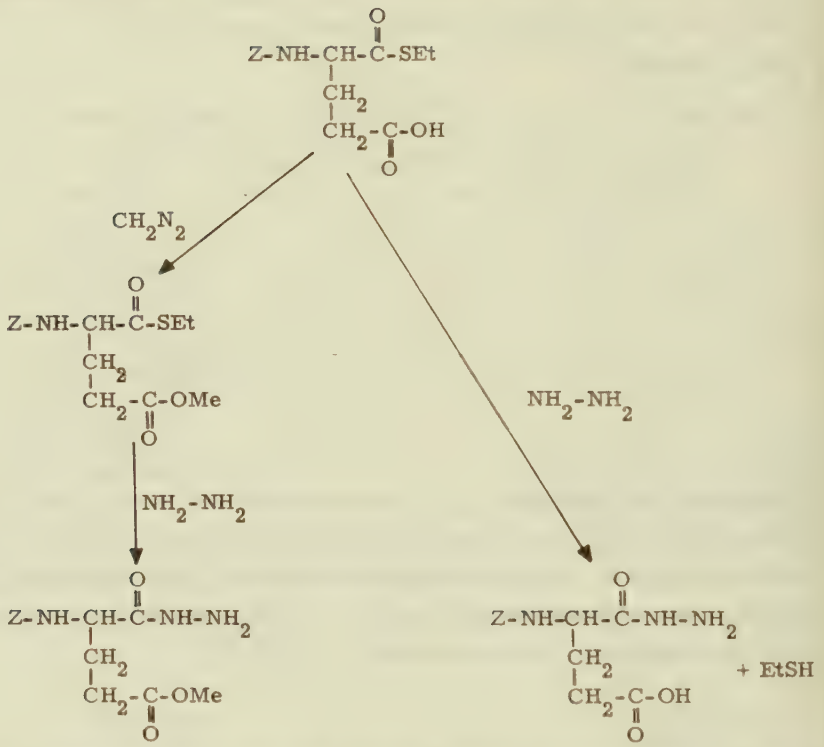


R = $-CH_2-CH_3$, $-CH_2-C_6H_5$

Einwirkung von Isobutylen (H_2SO_4 als Katalysator) in Dioxan auf den N-Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminsäure-α-ester liefert in guten Ausbeute die gewünschten Diester. Die Hydrazinolyse verläuft ohne Schwierigkeiten, jedoch sollte eine unnötig längere Reaktionszeit vermieden werden, da sonst auch der tert.-Butylester angegriffen wird. [3]

1) R. Schwyzer, H. Kappeler, Helv. 44, 1991 (1963)
2) H. Zahn, J. Meienhofer, Z. für Naturforschung Juni 1965, 646
3) s. 2)

Aus α-Thioester

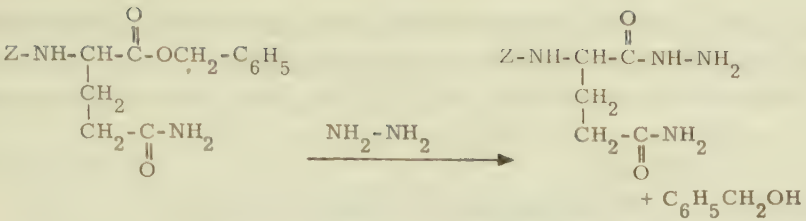


Der α-Thioester setzt sich mit Hydrazin leicht zum entsprechenden Hydrazid um. Der Diester ist einer selektiven Hydrazinolyse zugänglich, da das α-Carboxyl durch die Mercapto-Gruppe stärker aktiviert wird als das γ-Carboxyl durch die Methoxy-Gruppe.[1)]

Aus Glutaminester

Im Falle vom N-Acyl-Glutamin lassen sich die Hydrazide ohne Schwierigkeiten aus den entsprechenden Methylestern durch Umsatz mit Hydrazin synthetisieren.[2)]

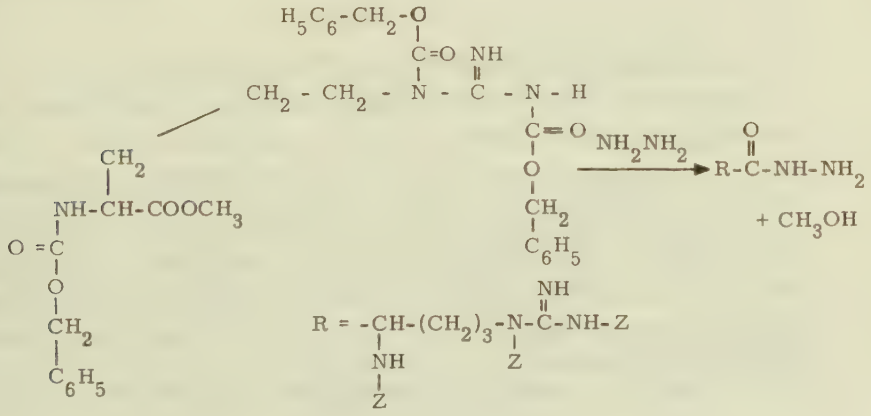
1) Th. Wieland, Angew. Chem. 71, 417 (1959)
2) E. Sondheimer, R.W. Holley, JACS 76, 2816 (1954)



b) Anwendung der Methode in der vorliegenden Arbeit

Wie erwähnt bilden sich während der Hydrazinolyse von N-Acyl-aminosäureester leicht unangenehme Nebenprodukte. Um diese Gefahr möglichst auszuschließen, wurde die Reaktion in der vorliegenden Arbeit nicht, wie in der Literatur öfters beschrieben, bei höherer Temperatur (Rückfluß) durchgeführt. Das Verfahren wurde durch ein milderes ersetzt, indem man den Ester bei 40°C mit 3 Äquivalenten Hydrazinhydrat in Methanol reagieren ließ. Fast alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen N-Benzyloxycarbonylaminosäure- bzw. -Peptidhydrazide konnten nach dieser Methode erhalten werden.

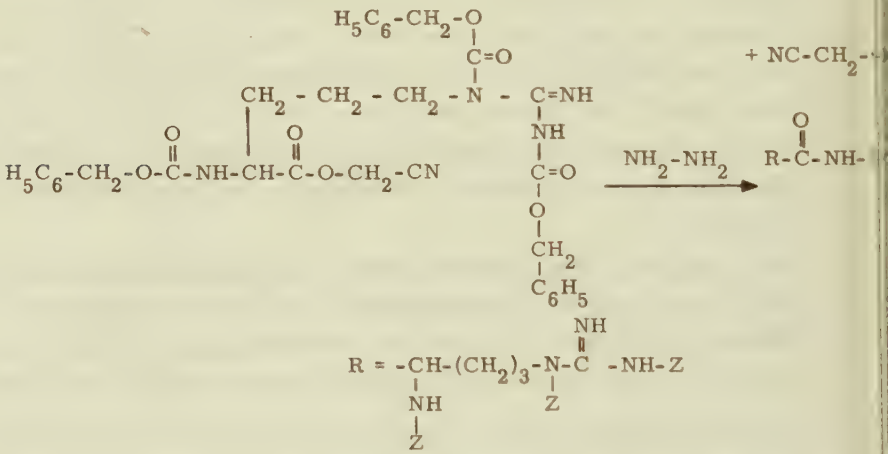
Eine Ausnahme hiervon bildet die Herstellung von Tricarbobenzoxy-L-argininhydrazid. Läßt man Tricarbobenzoxy-L-argininmethylester nach dem üblichen Procedere mit 3 Äquivalenten Hydrazinhydrat in Methanol bei 40°C stehen, so erhält man nicht das erwartete Hydrazid, sondern unverändertes Ausgangsmaterial.



Wir glauben, daß die drei voluminösen Benzyloxycarbonylgruppen im Molekül den nukleophilen Angriff des Hydrazins auf den Ester stark behindern. Daher verwendeten wir anstatt des Methylesters den stärker aktivierten Cyanmethylester. Damit hatten wir auch in der Tat Erfolg.

Synthese von Tribenzyloxycarbonyl-L-Arginin-hydrazid

Setzt man Tribenzyloxycarbonyl-L-Arginin-cyanmethylester[1] mit 3 Äquivalenten Hydrazin in Methanol bei ZT. um, so erhält man schon nach 3 Stunden mit 94 % Ausbeute in praktisch analysenreiner Form das gewünschte Hydrazid.



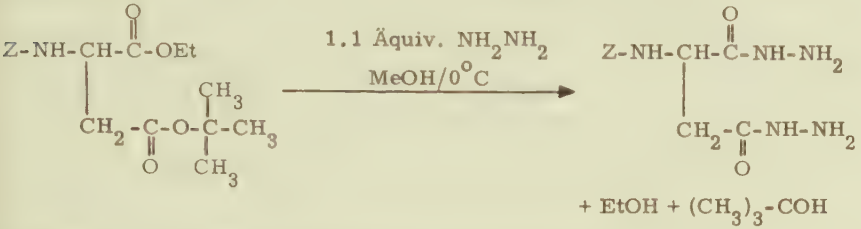
2. Indirekte Hydrazidierung: Sonderfall der Asparaginsäure

Die Herstellung von N-Acyl-Asparaginsäurehydraziden wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Dies hat seinen guten Grund, ist es doch im Falle der Asparaginsäure anders als bei Glutaminsäure. Es ist nicht möglich, durch Hydrazinolyse der N-Acylasparaginsäure-α-ester mit freiem oder maskiertem β-Carboxyl die entsprechenden Hydrazide zu erhalten. Selbst eine Maskierung der β-Carboxylgruppe durch tert.-Butyl gestattet nicht die erhoffte selektive Hydrazinolyse in α-Stellung. So erhielt Wünsch[2]

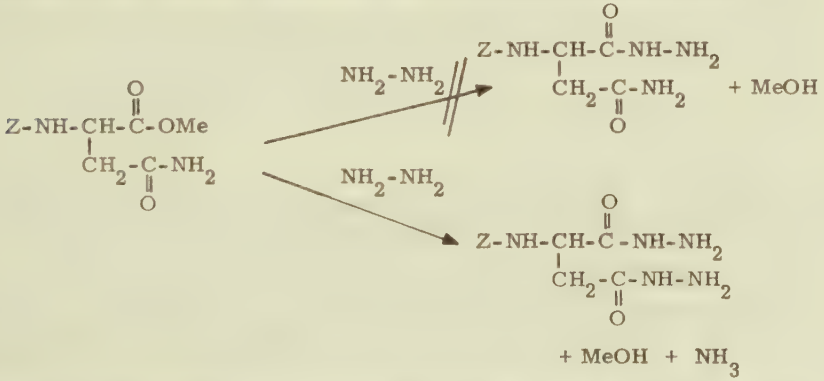
1) Vorschrift Seite 159

2) E. Wünsch, A. Zwick, Z.für physiol.Chem. 333, 108 (1963)

durch Umsatz von Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-α-Ethyl-β-tert. Butylester mit Hydrazin immer das Dihydrazid neben unverändertem Ausgangsmaterial.[1)]



Im Falle von Benzyloxycarbonyl-L-asparagin-Methylester beschreibt zwar H. Schüssler[2)] die Herstellung des Hydrazids durch Hydrazinolyse des Methylesters. Nach unsern Reaktionsergebnissen muß hier jedoch ein Irrtum vorliegen. Auch unter schonendsten Bedingungen, etwa bei Umsetzung des Benzyhloxycarbonyl-L-Asparagin-Methylesters mit 1.1 Äquivalent Hydrazinhydrat in Methanol bei 0°C, erhält man nur das Dihydrazid. Analysenwerte und Schmelzpunkte entsprechen dem Dihydrazid von Wünsch.

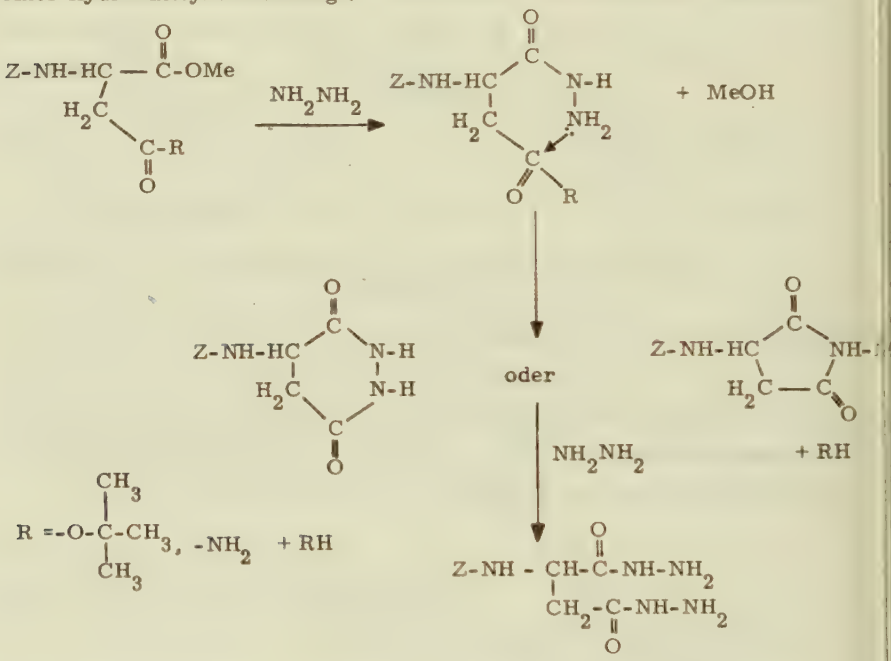


Diese Ergebnisse zeigen, daß einige Reaktionen, die bei Glutamin-Derivaten ohne Schwierigkeiten ablaufen, im Falle von Asparagin-Derivaten nicht möglich sind. Offensichtlich steht das Asparaginsäure-α-Carboxyl in ste-

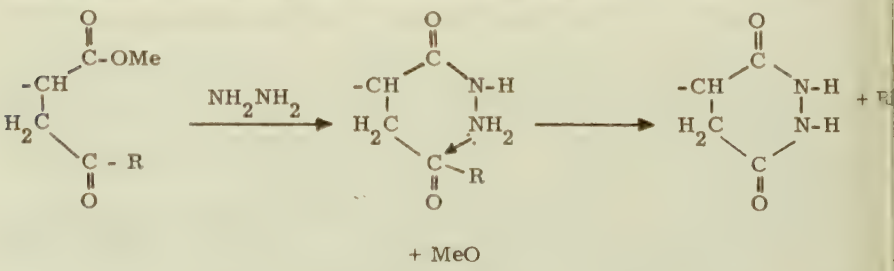
1) R. Schwyzer, H. Kappeler Helv. 46, 1975 (1963)
Vergleiche auch die unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeiten der tert.-Butylestergruppe bei Asparaginsäure- -tert. Butylester-Derivaten und den entsprechenden Glutaminsäure-Verbindungen.

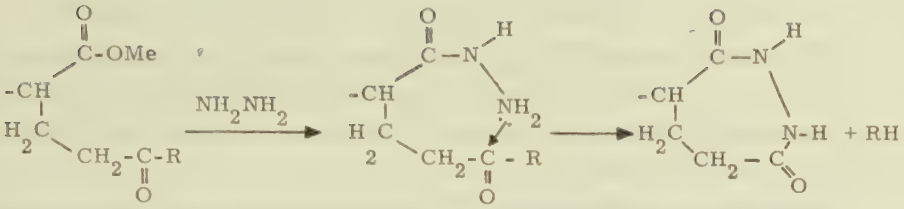
2) H. Schüssler, Dissert., Rheinisch-Westfälische TH, Aachen 1960

risch so günstiger Nachbarschaft zur Amidgruppe, daß primär gebildetes α-Hydrazid ein cyclisches Diacylhydrazin ausbildet, das dann seinerseits einer Hydrazinolyse unterliegt.

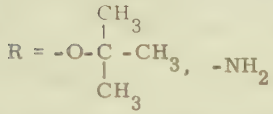


Bei der Hydrazinolyse von Benzyloxycarbonylasparaginsäure α-Methyl-β-tert.Butylester bzw. -asparaginmethylester weist das Zwischenprodukt einen Fünf- oder Sechs-Ring auf, während im analogen Fall bei der Glutaminsäure ein Sechs- oder Sieben-Ring ausgebildet werden müßte.



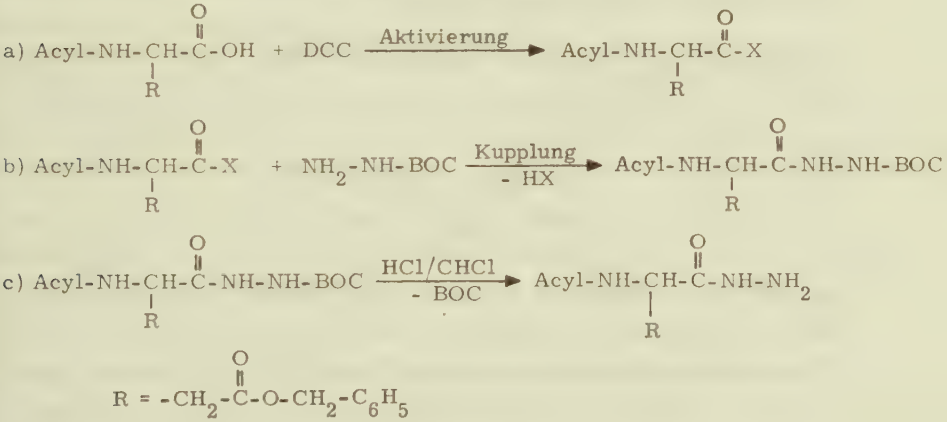


+ MeOH



Vielleicht ist die Ausbildung eines sterisch ungünstigen Zwischenproduktes dafür verantwortlich, daß die Hydrazinolyse von Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminsäure-α-Methyl-γ-tert. Butylester nicht zum unerwünschten Dihydrazid führt.

Angesichts dieser Schwierigkeiten wählten wir, wie am Titel dieses Kapitels angedeutet, die indirekte Synthese zur Herstellung von N-geschützten Aminosäurehydraziden. Sie verläuft folgendermaßen:



So ergaben sich folgende

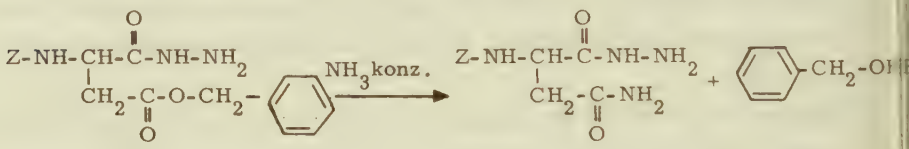
Synthesen von Benzyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure-α-hydrazid-β-benzylester, -L-Asparagin-hydrazid und -L-Asparaginsäure-α-hydrazid.

Benzyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure-Dibenzylester wird nach der Methode von Berger und Katchalski hergestellt; durch selektive Verseifung wird

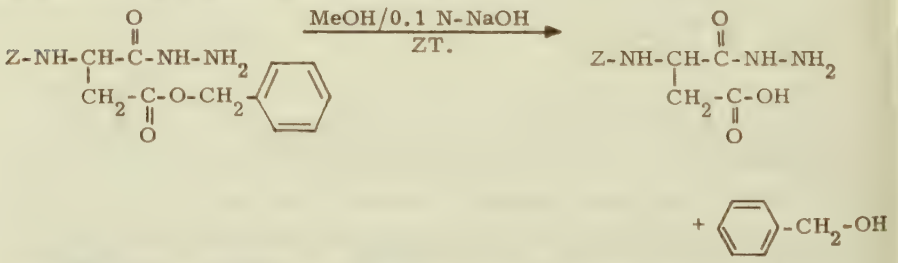
daraus der entsprechende -Benzylester erhalten. Mit Hilfe der DCC-Methode kuppelt man mit BOC-Hydrazin und in einem direkt anschließenden Schritt wird die BOC-Schutzgruppe selektiv mit Salzsäure in Chloroform abgespalten. Das erhaltene Hydrazid-Hydrochlorid setzt man mit 2 N-Ammoniak zum gewünschten Hydrazid um.

Die Kupplung von BOC-Hydrazin an Benzyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure-β-Benzylester und die daran anschließende BOC-Abspaltung verläuft mit einer Totalausbeute von 74 % (siehe Seite 156).

Durch Umsatz des β-Benzylesters mit konz. Ammoniak in Wasser erhält man in 63 % Ausbeute das gewünschte Benzyloxycarbonyl-L-Asparaginhydrazid. (siehe Seite 157).



N-Benzyloxycarbonyl-Asparaginsäure-α-hydrazid wird durch Verseifen des entsprechenden Benzyhlesters erhalten.

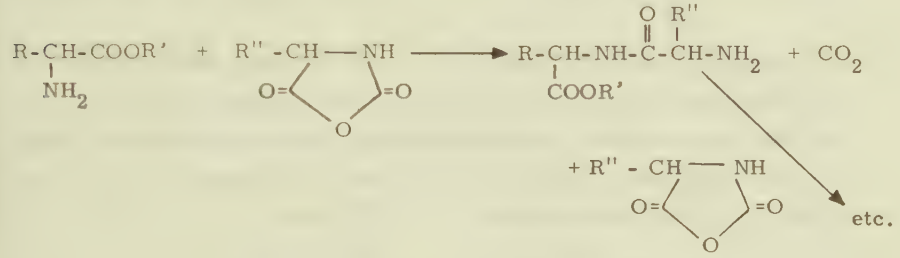


Es muß jedoch erwähnt werden, daß sich in alkalischem Milieu das cyclische Diacylhydrazin ausbilden könnte, und daher eventuell ein Gemisch von N-Benzyloxycarbonyl-Asparaginsäure-α bzw. β-hydrazid erhalten wird. Ob diese Vermutung zutrifft wurde nicht weiter untersucht. (Siehe Seite 157).

II. Aminodiacylhydrazine nach dem N-Carboxyanhydridverfahren

1. Allgemeines zur Reaktion von Basen mit α-Aminosäure-N-carboxyanhydriden

α-Aminosäure-N-carboxyanhydride (Oxazolidin-2,5-dione) reagieren leicht unter Ringöffnung mit Nukleophilen wie z.B. Aminosäuren- oder Peptidestern. Ihre Verwendung in der gezielten Peptidsynthese ist jedoch nicht üblich, denn sie besitzen große Neigung mit dem im ersten Reaktionsschritt gebildeten Produkt weiterzureagieren, so daß eine kontrollierte Umsetzung nicht möglich ist.

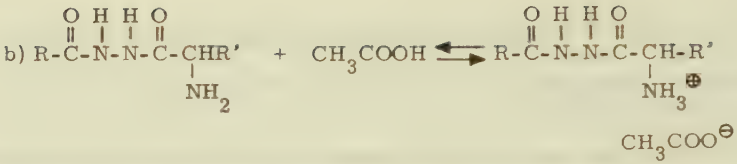


Hingegen haben sie Bedeutung als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Polyaminosäuren erlangt.[1)]

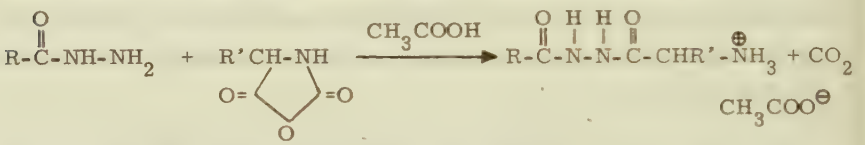
Es ist daher bei der Reaktion einer Base mit einem Aminosäure-N-carboxyanhydrid nur dann ein einheitliches Reaktionsprodukt zu erwarten, wenn die entstehende α-Aminogruppe kinetisch benachteiligt ist. Diese Bedingung ist beim Umsatz eines N-Carbonxyanhydrides mit einem Säurehydrazid in Eisessig erfüllt: Die Hydrazidgruppe ist stärker nukleophil als die entstehende Aminogruppe, und die Aminogruppe wird durch den Eisessig stärker protoniert als die Hydrazidgruppe.[2)]

1) CH. Bamford, A. Elliott, W. Hanby, Synthetic Polypeptides, Acad. Press (1958); E. Katchalski, M. Sela, Adv. in Prot. Chem. XII, 243 (1958)

2) Vergleiche auch R.P. Bell: The Proton in Chemistry, Cornell University Press 1959, S. 37. ("Eine Base, die stärker als Anilin ist, ist in Eisessig völlig protoniert.")



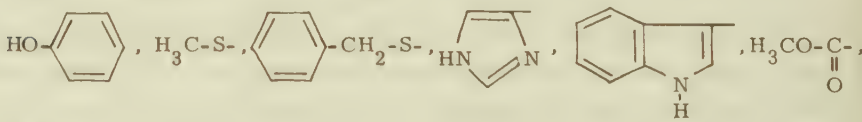
Man beobachtet daher den folgenden relativ einheitlichen Reaktionsablauf beim Umsatz von Säurehydraziden mit N-Carboxyanhydriden.



α-Aminodiacylhydrazine sind in Eisessig nicht unbegrenzt haltbar. Sie können indessen dank dem raschen und quantitativen Umsatz von Hydrazid und N-Carboxyanhydrid auf Zusatz einer starken Säure (z.B. Salzsäure oder Trifluoressigsäure) schon nach 10 Minuten meist leicht und als gut kristallierende Salze isoliert werden.

2. Anwendung der Methode in der vorliegenden Arbeit

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Aminodiacylhydrazine sind neu und konnten nach der oben beschriebenen Reaktion ohne besondere Schwierigkeiten erhalten werden. Die ungeschützten funktionellen Seitengruppen wie HO-,



$H_2N-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-$, geben dabei, was besonders hervorzuheben ist, keinen Anlaß zu Nebenreaktionen! Die nachfolgende Tabelle enthält die Zusammenstellung der auf diesem Wege hergestellten α-Aminodiacylhydrazinen.

Tabelle 6

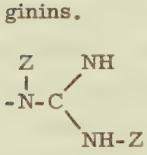
α-Aminodiacyl-hydrazin-Hydrochloride

Herstellung nach dem N-Carboxyanhydridverfahren

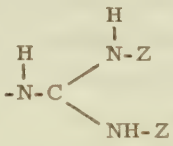
No	Verbindung	Umkristallisiert aus	Smp. °C
1)	Z-DL-Ala-hy-GlyH. HCl	abs. Alkohol	
2)	Z-DL-Phe-hy-GlyH. HCl	abs. Alkohol	189-191
3)	Z-DL-Leu-hy-GlyH. HCl	abs. Alkohol/Äther Pe-äther	184-187
4)	Z-DL-Ser-hy-GlyH. HCl	abs. Alkohol	184-187
5)	Z-DL-Thre-hy-GlyH. HCl	abs. Methanol	192-200
6)	Z-DL-Allothre-hy-GlyH. HCl	abs. Methanol	201-204
7)	Z-L-Tyr-hy-GlyH. HCl	abs. Methanol/Äther	148 Zers.
8)	Bz-S-N-Z-L-Lys-hy-GlyH	abs. Alkohol	181-187
9)	Z-DL-Met-hy-GlyH. HCl	abs. Alkohol	191-198
10)	Z-N^{α}-BOC-N^{ε}-L-Lys-hy-GlyH. HCl	Aceton/Pe-aether	102-105
11)	Z-N^{α}-Z-L-Lys-hy-GlyH. HCl	Alkohol/Äther	122-124
12)	Z-DL-Try-hy-GlyH. HCl	abs. Alkohol	214-218
13)	Z-L-His-hy-PheH (frei)	(Oel)	
14)	Z-L-Asp(OBz)-hy-GlyH. HCl	abs. Alkohol	155 Zers.
15)	Z-L-Asp(NH_2)-hy-PheH (frei)	Wasser	193-195
16)	Z-L-Gly(NH_2)-hy-GlyH. HCl	abs. Alkohol	161-162
17)	Z-L-Glu(OMe)-hy-PheH. HCl	abs. Alkohol/ Äther	148-150
18)	Z-L-Glu(OH)-hy-Phe. HCl	abs. Alkohol	185-190
19)	Z-DL-Glu(OH)-hy-Phe (frei)	abs. Alkohol	135 Zers.

No	Verbindung	Umkristallisiert aus	Smp. °C
20)	Z-DL-Pro-hy-GlyH.HCl	abs. Alkohol	201-203
21)	Z-Gly-hy-L-ProH (frei)	abs. Alkohol/ Äther/Pe-Äther	142-143
22)	Z-Gly-hy-SarH.HCl	abs. Alkohol	165 Zers.
23)	Z-DL-Phe-hy-SarH.HCl	Alkohol/Wasser	172 Zers.
24)	Z-DL-Thre-hy-SarH.HCl	abs. Alkohol	178 Zers.

Eine Ausnahme im Verhalten gegenüber N-Carboxyanhydriden zeigte lediglich die zweifach Benzyloxycarbonyl-substituierte Guanido-Gruppe des Arginins.



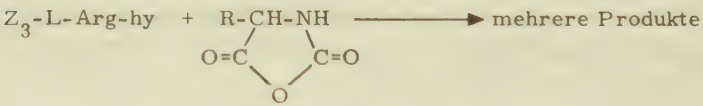
(a)



(b)

(mögliche Strukturen)[1)]

Setzt man nämlich Tribenzyloxycarbonyl-L-Arginin-hydrazid mit einem Aminosäure-N-Carboxyanhydrid um, so werden, wie das DC zeigt, mehrere Produkte gebildet.



Der Anlaß zur Bildung dieser verschiedenen Produkte ist nicht ganz klar. Vielleicht ist die Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe am Guanido-Rest in Eisessig nicht stabil, sodaß eine Acylierung durch das N-Carboxyanhydrid an dieser Stelle erfolgen kann. Ob dies allerdings zutrifft, wurde weiter nicht untersucht.

---

1) L. Zervas, M. Winitz, J.P. Greenstein, JACS 83, 3300 (1961)

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Übersicht über einige präparative und analytische Methoden

Die Schmelzpunkte sind auf einem Kofler-Block bestimmt worden und sind korrigiert; Fehlergrenze $\pm 2^{\circ}$. Zur Identifizierung unbekannter Substanzen wird mit der Vergleichssubstanz ein Mischschmelzpunkt genommen und festgestellt, ob dieser gegenüber dem Schmelzpunkt der Vergleichssubstanz Depression zeigt. In den folgenden Versuchsvorschriften wird dieser Vorgang einfachheitshalber mit Identifizierung: MSmp abgekürzt.
Die zu Identifikationen herangezogenen Infrarot-Spektren sind mittels der KBr-Pressling-Methode auf einem "Infracord Mod. 21" der Fa. Perkin-Elmer aufgenommen worden.

I. Dünnschichtchromatographie

Zur raschen Information über den Verlauf der Umlagerungsreaktionen, zur Identifizierung von Substanzen durch Vergleich ihres chromatographischen Verhaltens und für Reinheitskontrolle von Substanzen wurde die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G[1] in der Ausführungsform von Brenner und Mitarbeitern benützt.[2]
Es werden folgende Lösungsmittelgemische als Fließmittel benützt:

1. $HCCl_3$/MeOH 2:1 (V/V)
   $HCCl_3$/MeOH 10:1 (V/V)
   a) Zur Verfolgung der Umlagerungsreaktionen
   b) Reinheitsprüfung für Carbobenzoxy-Aminosäuren, -Estern, -Hydraziden, -Dipeptidestern -Dipeptidhydraziden.
2. Propanol/H_2O 7:3 (V/V)
   n-Butanol/Eisessig/H_2O 4:1:1 (V/V/V)
   a) Zur Trennung von Aminosäuren

Die Reagenzien, die für die Identifizierung der synthetisierten Substanzen verwendet werden, sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

1) E. Stahl, Pharmazie 11, 633 (1956)
2) M. Brenner, A. Niederwieser, G. Pataki, Experientia 16, 378 (1960) 17, 145 (1961)

Reagens	Hydrazid	Salicyl-hydrazon	Aminodiacyl-hydrazin
Ninhydrin [x]	nach starkem Erhitzen schwach gelb	---	stark gelb-rot
Chlor/Tolidin	blau	blau	blau
Tollens [xx]	braun-schwarz	---	---
UV 254 m Platte mit Zinksilikat-Zusatz	----- (sehr schwach)	sehr starke Fluoreszens	starke Absorption

x 1,5 g Ninhydrin in 15 ml Eisessig + 500 ml n-Butanol

xx 0,5 ml 0.1 N-$AgNO_3$ + 0.5 ml 2 N-NaOH + 2 N-NH_3 (bis gelöst), mit H_2O auffüllen auf ca. 40 ml.

Durch Kombination dieser Nachweisreagenzien kann man ohne weiteres eine unbekannte Substanz zu einer dieser Verbindungsklasse zuordnen. Beispielsweise läuft bei einer Umlagerung das N-Acyl-aminosäurehydrazid fast gleich weit wie das Isomere Aminodiacylhydrazin, so stellt man 2 Chromatogramme des Substanzgemisches her, chromatographiert und entwickelt das eine mit Ninhydrin-, das andere mit Tollensreagens.
Die Hydrochloride von N-(Acyl)-N'-(α-aminoacyl)-hydrazinen laufen auf den Chromatogrammen gleich weit wie die entsprechenden freien Basen.

Bei Identifizierung von Substanzen ist es wichtig, daß die bekannte Substanz auf der gleichen Platte mit der unbekannten Substanz verglichen wird, wobei eventuell in mehreren Systemen chromatographiert wird, um die Identität der R_f-Werte festzustellen.
In den folgenden Versuchsvorschriften wird diese dünnschichtchromatographische Identifizierung unbekannter Substanzen einfachheitshalber mit -Identifizierung: DC - abgekürzt.

Figur 1 zeigt das Verhalten einiger in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Verbindungen auf einem Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G mit Chloroform/Methanol 2:1 (V/V) als Fließmittel (Laufzeit ca. 20 Min.).

Figur 1

Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G mit Chloroform/Methanol 2:1 (V/V) als Fließmittel

~10γ Substanz aufgetragen

1. Z-DL-Leu-hy,
2. Z-DL-Leu-hy-GlyH. HCl
3. Z-DL-Leu-hy-GlyH
4. Z-DL-Leu-Gly-hy
5. Z-DL-Leu-Gly-hy-Sal
6. Z-L-Glu-hy
   OH
7) Z-L-Glu-hy-L-PheH
   OH
8) Z-L-Glu-hy-L-PheH
   OMe
9) Z-L-Glu-L-Phehy
   OH
10) Glycindiketopiperazin
11) Hydrazin

In diesem Fließmittel laufen α-Aminodiacyl-hydrazine immer etwas weniger weit als die isomeren, durch Umlagerung entstehenden N-Acyl-Aminosäurehydrazide.

II. Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Herstellung der Ausgangsmaterialien

a) Veresterung der N-Acyl-Aminosäure mit Diazomethan

Man löst 1 g der zu veresternden Säure in 30 ml abs. MeOH, kühlt auf 0°C ab, tropft unter Rühren eine ätherische Diazomethanlösung (hergestellt aus N-Nitroso-N-methyl-p-toluol-sulfonamid nach Th. J. de Boer/H. J. Backer, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 73, 229 (1954)) bis zur bleibenden Gelbfärbung zu. Oft fällt durch den ätherischen Zusatz die Substanz vor Beendigung der Veresterung aus, sodaß es vorteilhaft ist, die Lösung i. V. einzudampfen und wieder mit abs. MeOH aufzunehmen. Man dampft nach beendigter Veresterung die Lösung i. V. ein und erhält fast quantitativ den Methylester, der ohne Umkristallisation direkt weiterverwendet werden kann.

b) Hydrazinolyse von N-Acyl-aminosäureestern

Man löst 1 Mol N-Acyl-aminosäure-methylester in ca. 20ml abs. MeOH, gibt 3Mol Hydrazinhydrat zu, läßt über Nacht bei 40°C stehen, wobei meistens das Hydrazid ausfällt. Ist dies nicht der Fall, so dampft man die Lösung i. V. ein, kristallisiert aus einem geeigneten Lösungsmittel um und trocknet i. V. über konz. H_2SO_4. Ist ein Hydrazid nicht wasserlöslich, so kann man vorteilhafterweise die Kristalle mit H_2O auswaschen und somit sehr leicht das überschüssige Hydrazinhydrat entfernen, was sonst oft nur durch mehrmaliges Umkristallisieren geschehen kann.

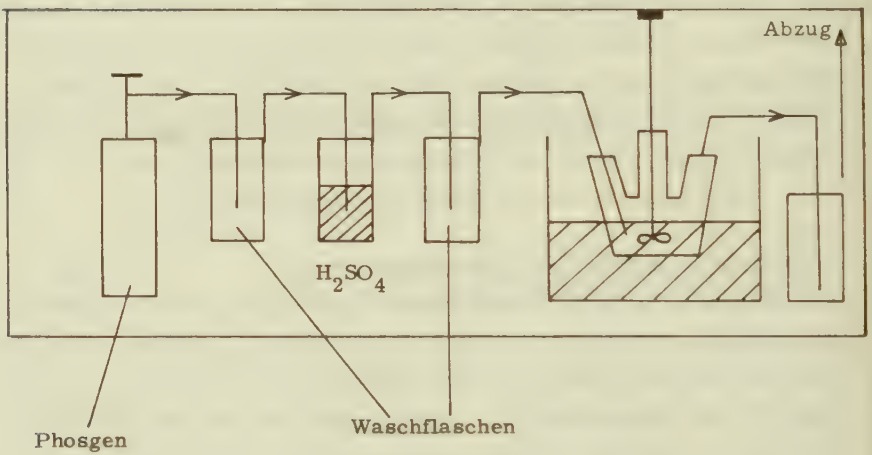
c) Herstellung von Aminosäure-N-carboxyanhydriden nach der Phosgenmethode [1]

Man suspendiert 5 g Aminosäure in 100 ml abs. Dioxan, leitet unter heftigem Rühren bei 50°C einen trockenen Phosgenstrom durch, bis sich die Aminosäure vollständig gelöst hat. Das überschüssige Phosgen wird mit Hilfe eines trockenen Stickstoffstromes (Durchleiten durch zwei Waschflaschen mit NaOH) aus der Lösung entfernt, das Lösungsmittel unter Feuchtigkeitsausschluß am Vakuum bei ca. 40°C abgedampft und der ölige Rückstand meist aus Essigester/Petroläther kristallisiert und bei 0°C über Nacht stehen ge-

1) A.C. Farthing, R.J.W. Reynolds, Nature 165, 647 (1950)

lassen. Die Kristalle werden abfiltriert, mit Pentan ausgewaschen und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.

Apparatur zur Herstellung von α-Aminosäure-N-carboxy-anhydriden nach der Phosgenmethode



III. Qualität der meist verwendeten Lösungsmittel

Dioxan:	Im Handel erhältliches Dioxan wurde zweimal über Natrium destilliert und im Dunkeln aufbewahrt.
Dimethyl-formamid:	Im Handel erhältliches Produkt wurde zweimal über P_2C_5 destilliert.
Eisessig:	Es wurde das puriss. Produkt der Firma Fluka verwendet.
Chloroform:	Absolutes Chloroform, das als Lösungsmittel meist bei der Kupplung mittels der gemischten Anhydridmethode[1)] verwendet wird, wurde vor Gebrauch stets zweimal über P_2O_5 getrocknet.
abs. Methanol:	Es wurde das puriss. Produkt der Firma Fluka verwendet.
abs. Äther:	Im Handel erhältliches Produkt wurde zweimal über Natrium destilliert und über Natrium im Dunkeln aufbewahrt.

1) R.A. Boissonas, Helv. 34, 874 (1951)

B. Synthesen von N-(Acyl)-N'-(α-aminoacyl)-hydrazinen

I. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von α-Aminodiacyl-hydrazinen nach dem Carboxyanhydridverfahren

Man löst 1 g N-Acylaminosäurehydrazid in 20 - 100 ml Eisessig (sehr unterschiedlich), gibt bei ZT. unter Rühren (Magnetrührer, $CaCl_2$-Rohr) 1 Äquivalent Aminosäure-N-carboxy-anhydrid zu, wobei sofort CO_2-Entwicklung auftritt. Man läßt 5 Minuten rühren, entgast danach unter leichtem Vakuum und gibt 1 Äquivalent wässrige 1N-HCl zu. Man dampft bei 40°C i.V. ein, wobei meist das Salz als feste, weiße Substanz zurückbleibt. Es ist vorteilhaft noch zweimal mit je 10 ml abs.EtOH zu versetzen und i.V. einzudampfen. Das Salz kann fast immer gut aus Lösungsmittelgemischen wie abs. EtOH/Ae, EtOH/Ae/PeAe etc. kristallisiert werden. Um die freie Base zu erhalten, löst man das Salz in möglichst wenig Wasser und fügt 1 Äquivalent 1 N-NaOH oder Triaethylamin zu. Dabei fällt meistens die Base sofort aus. Die Ausbeuten an -Aminodiacylhydrazinen bzw. -hydrochloriden liegt zwischen 75-97 %.

II. Genaue Vorschriften zur Herstellung von α-Aminodiacylhydrazinen

1. N-(Z-DL-Alanyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (1)

a) Z-DL-Ala-hy-GlyH.HCl (1a)

Man löst 4.0 g (17.9 mMol) Benzyloxycarbonyl-DL-alanin-hydrazid in 40 ml Eisessig, fügt unter Rühren bei ZT. 1.81 g (17.9 mMol) Glycin-N-Carboxyanhydrid hinzu, rührt 5 Minuten, entgast i.V., versetzt mit 17.9 ml 1 N-HCl, dämpft die Lösung i.V. ein und trocknet den weißen Rückstand im Exsikkator über P_2O_5. Die Substanz wird aus abs. Alkohol (Spur Wasser) kristallisiert, abfiltriert, mit abs. Alkohol ausgewaschen und über P_2C_5 getrocknet.

Ausbeute:	5.2 g (88 %)
Smp:	203 - 206°C

Im System $HCCl_3$/MeOH 2:1 ist der R_f-Wert 0.20.
Zur Analyse wird aus abs. EtOH (Spur H_2O) kristallisiert und während 14 Stunden bei 60°C und 0.05 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{13}H_{19}N_4O_4Cl$		C	H	N
(330.784)	gef.	47,38	5.97	16.86
	ber.	47.20	5.79	16.94

b) Z-DL-Ala-Hy-GlyH (1)

Man löst 4.0 g (12 mMol) Z-DL-Ala-hy-Gly-H.HCl (1a) in 15 ml H_2O und versetzt mit 12 ml 1N-NaOH. Sofort erfolgt eine Trübung, jedoch fällt kein Niederschlag aus. Man dampft die Lösung i.V. auf ca. 5 ml ein, läßt über Nacht bei 0° stehen, filtriert den ausgefallenen Niederschlag ab und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 2.88 g (81 %) (rötliche Kristalle)

2. N-(Z-DL-Phenylalanyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (2)

a) Z-DL-Phe-hy-GlyH.HCl (2a)

Man löst 5.1 g (16.4 mMol) N-Carbobenzoxy-phenylalanyl-hydrazid in 50 ml Eisessig, fügt bei ZT. unter Rühren 1.66 g (16.4 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid zu, läßt 5 Minuten rühren und entgast i.V.. Die Lösung wird mit 16.4 ml 1N-HCl versetzt, unter vermindertem Druck bei 40°C eingedampft, im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet und aus abs. Alkohol umkristallisiert.

Ausbeute: 5.87 g (88.5 %)

Smp.: 189 - 191°C

Der R_f-Wert der Substanz ist im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.20. Zur Analyse wird aus abs. EtOH umkristallisiert und bei 60°C und 0.03 Torr 30 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{19}H_{23}H_4O_4Cl$		C	H	N
(406.882)	gef.	56.01	5.89	13.88
	ber.	56.08	5.69	13.77

b) Z-DL-Phe-hy-GlyH (2)

Man löst 5 g (12.3 mMol) Z-DL-Phe-hy-GlyH.HCl (2a) in 10 ml Wasser und fügt 12.3 ml 1N-NaOH zu. Es entsteht ein weißer, schleimiger Nieder-

schlag, der abfiltriert und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet wird.

Ausbeute: 4.2 g (91 %) (rötliche Kristalle)

3. N-(Z-DL-Leucyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (3)

a) Z-DL-Leu-hy-GlyH.HCl (3a)

Man löst 4.0 g (14.3 mMol) N-Carbobenzoxyleucinhydrazid in 40 ml Eisessig, fügt 1.45 g (14.3 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid unter Rühren bei ZT. zu, entgast am Vakuum, läßt noch 5 Minuten weiterrühren und versetzt mit 14.3 ml 1N-HCl. Die Lösung wird unter vermindertem Druck bei 40°C eingedampft, der Rückstand (gelbes Oel) in abs. Alkohol aufgenommen, mit Tierkohle gekocht und durch Cellit filtriert. Auf Zusatz von Äther/Petroläther kristallisiert ein weißer Niederschlag aus, der nach Stehen über Nacht bei 0°C abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet wird.

Ausbeute: 4.47 g (84 %)

Smp.: ab 174°C Zersetzung

Zur Analyse wird aus abs. Alkohol/Äther/Petroläther kristallisiert und bei 65°C und 0.05 Torr 16 Stunden über P_2C_5 getrocknet.

$C_{16}H_{25}N_4O_4Cl$		C	H	N
(372.865)	gef.	51.61	6.92	15.05
	ber.	51.54	6.76	15.03

b) Z-DL-Leu-hy-GlyH (3)

Man löst 3 g (8.0 mMol) Z-DL-Leu-hy-GlyH.HCl (3a) in 10 ml H_2O und fügt 8.0 ml 1N-NaOH zu. Es bildet sich eine Trübung, doch Kristallisation konnte auch bei längerem Stehen nicht erzielt werden. Die Lösung wird unter vermindertem Druck eingedampft, mit wenig Eiswasser ausgewaschen und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet. Die Substanz färbt sich an der Luft nach einem Tag rötlich

Ausbeute: 2.44 g (90.5 %)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.21.

4. N-(Z-DL-Serinyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (4)

a) Z-DL-Ser-hy-Glyh.HCl (4a)

Man löst 2.9 g (11.4 mMol) N-Carbobenzoxyserinhydrazid in 30 ml Eisessig, fügt 1.16 g (11.4 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid unter Rühren bei ZT. zu und entgast am Vakuum; nach weiteren 2 Minuten Rühren gibt man 11.4 ml 1N-HCl zu und dampft unter vermindertem Druck ein. Der Rückstand wird aus abs. Alkohol (Spur Wasser) kristallisiert, und man erhält 3.2 g (80 %) chromatographisch reines Hydrochlorid vom Smp. 184-186°C.
Zur Analyse wird aus abs. Alkohol (Spur Wasser) kristallisiert und bei 70°C und 0.01 Torr 18 Stunden über P_2C_5 getrocknet.

$C_{13}H_{19}N_4C_5CL$		C	H	N
(346.784)	gef.	44.81	5.79	16.01
	ber.	45.02	5.52	16.16

b) Z-DL-Ser-hy-GlyH (4)

Man löst 1.42 g (4.09 mMol) Z-DL-Ser-hy-GlyH.HCl (4a) in 5 ml H_2O und versetzt mit 4.09 ml 1N-NaOH. Nach Stehen über Nacht bei 0°C bildet sich ein weißer Niederschlag, der abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet wird.

Ausbeute: 1.15 g (90.5 %)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.12.

5. N-(Z-DL-Threonyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (5)

a) Z-DL-Thre-hy-GlyH.HCl (5a)

Man löst 4 g (15 mMol) Z-DL-Threoninhydrazid in 60 ml Eisessig und gibt unter Rühren bei ZT, auf einmal 1.52 g (15 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid zu. Es setzt sofort CO_2-Entwicklung ein, man entgast am Vakuum und gibt nach 2 Minuten 15.0 ml 1N-HCl zu. Danach wird unter vermindertem Druck bei 40°C eingedampft und der Rückstand aus abs. Methanol (Spur Wasser) kristallisiert.

Ausbeute: 5.01 g (89 %)

Smp.: 192 - 200°C

Zur Analyse wird aus abs. Methanol (Spur Wasser) kristallisiert und 18 Stunden bei 70°C und 0,01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{14}N_{21}N_4O_5Cl$		C	H	N
(374.838)	gef.	46.73	6.10	15.30
	ber.	46.60	5.84	15.53

b) Z-DL-Thr-hy-GlyH (5)

Man löst 3.0 g (8 mMol) Z'DL-Thre-hy-Gly-H.HCl (5a) in 10 ml Wasser und versetzt mit 8 ml 1N-NaOH. Unter vermindertem Druck wird auf ca.5 ml eingeengt, zur Kristallisation über Nacht bei 0°C stehen gelassen. Der rötliche Niederschlag wird abfiltriert, mit wenig Eiswasser nachgewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 1.93 g (71 %)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.12.

6. N-(Z-DL-Allothreonyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (6)

a) Z-DL-Allothre-hy-GlyH.HCl (6a)

Man löst 3 g (11.3 mMol) Z-DL-Allothreoninhydrazid in 110 ml Eisessig (Lösung war noch etwas trübe), gibt auf einmal 1.15 g (11.3 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid zu, entgast am Vakuum; nach weiteren 2 Minuten Rühren gibt man 11.3 ml 1N-HCl zu und dampft unter vermindertem Druck bei 40°C ein. Der Rückstand wird aus abs. Methanol (Spur Wasser) kristallisiert.

Ausbeute: 3.9 g (93 %)

Smp.: 201 - 204°C

Zur Analyse wird aus abs. Methanol (Spur Wasser) kristallisiert und 16 Stunden bei 75°C und 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{14}H_{21}N_4O_5CL$		C	H	N
(374.838)	gef.	46.82	6.06	15.24
	ber.	46.60	5.87	15.53

b) Z-DL-Allothre-hy-GlyH (6)

Man löst 2 g (5.33 mMol) Z-DL-Allothre-hy-GlyH.HCl (6a) in 10 ml Wasser und versetzt mit 5.33 ml 1N-NaOH. Es entsteht ein rötlicher, schleimiger Niederschlag, der nach Stehen über Nacht bei 0°C abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet wird.

Ausbeute: 1.45 g (80 %)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.12.

7. N-(Z-L-Tyrosyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (7)

a) Z-L-Tyr-hy-GlyH.HCl (7a)

Man löst 2.66 g (8.1 mMol) Z-L-Tyrosinhydrazid in 100 ml Eisessig, gibt auf einmal 0.85 g (3.1 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid zu (worauf die noch etwas trübe Lösung klar wird); nach weiteren 2 Minuten Rühren entgast man am Vakuum und versetzt mit 8.1 ml 1N-HCl. Die Lösung wird unter vermindertem Druck bei 40°C eingedampft, der Rückstand über P_2O_5 getrocknet, und danach aus abs. Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 3.1 g (91 %)

Smp.: ab 148°C zers.

Zur Analyse wird aus abs. Methanol/Äther kristallisiert und 16 Stunden bei 70°C und 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{19}H_{23}O_5N_4CL$		C	H	N
(422.882)	gef.	53.69	5.73	13.28
	ber.	53.96	5.48	13.25

b) Z-L-Tyr-hy-GlyH (7)

Man löst 2.5 g (5.92 mMol) Z-L-Tyr-hy-GlyH.HCl (7a) in 10 ml Wasser und versetzt mit 5.92 ml 1N-NaOH. Dabei bildet sich ein weißer Niederschl der nach Stehen über Nacht bei 0°C abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet wir

Ausbeute: 2.05 g (89 %) (rötliche Kristalle)

Der R_f-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOh (2:1) 0.17.

8. N-(Z-S-Bz-L-Cysteinyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (8)

a) Z-N-S-Bz-L-Cys-hy-GlyH.HCl (8a)

Man löst 3.7 g (10.3 mMol) S-Benzyl-N-carbobenzoxy-L-cystein-hydrazid in 40 ml Eisessig unter Rühren fügt 1.09 g (10.3 mMol) GlycinN-carboxyanhydrid zu. Sofort setzt CO_2-Entwicklung ein; nach 5 Minuten Rühren wird am Vakuum entgast, die Lösung mit 10.3 ml 1N-HCl versetzt und unter vermindertem Druck bei 40°C eingedampft. Der gut getrocknete Rückstand (Hochvakuum) wird aus abs. Alkohol kristallisiert, abfiltriert und mit abs. Alkohol ausgewaschen.

Ausbeute: 3.58 g (84 %)

Smp.: 183 - 187°C

Zur Analyse wird aus abs. Alkohol kristallisiert und bei 60°C und 0.01 Torr 14 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{20}H_{25}O_4N_4SCl$		C	H	N
(452.975)	gef.	53.27	5.61	12.50
	ber.	53.03	5.56	12.37

b) Z-N-S-Bz-L-Cys-hy-GlyH (8)

Man löst 4.78 g (10.5 mMol) Z-N-S-Bz-L-Cys-hy-GlyH.HCl (8a) in 10 ml Wasser und versetzt mit 10.5 ml 1N-NaOH. Es entsteht ein weißer, schleimiger Niederschlag, der nach Stehen über Nacht bei 0°C abfiltriert und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet wird. Der trockene Niederschlag färbt sich an der Luft nach kurzer Zeit rötlich.

Ausbeute: 3.9 g (88.7 %)

Der R_f-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.36.

9. N-(Z-DL-Methionyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (9)

a) Z-DL-Met-hy-GlyH.HCl (9a)

Man löst 6.0 g (19.3 mMol) N-Carbobenoxymethioninhydrazid in 60 ml Eisessig, fügt unter Rühren bei ZT. auf einmal 2.03 g (0.20 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid hinzu, entgast am Vakuum, läßt 5 Minuten Rühren und ver-

setzt dann mit 19.3 ml 1N-HCl. Unter vermindertem Druck dampft man bei 40°C ein und trocknet den Rückstand über P_2O_5.
Man kristallisiert aus abs. Alkohol (zum vollständigen Lösen werden noch Tropfen Wasser zugegeben), filtriert den entstandenen Niederschlag ab, wäscht mit abs. Alkohol nach und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 6.7 g (89 %)
Smp.: 191 - 198°C

Zur Analyse wird aus abs. Alkohol (Spur Wasser) umkristallisiert und bei 60°C und 0.05 Torr 12 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{15}H_{23}N_4O_4SCl$		C	H	N
(390.904)	gef.	46.39	6.13	14.11
	ber.	46.09	5.93	14.36

b) Z-DL-Met-hy-GlyH (9)

Man löst 3.41 g (8.72 mMol) Z-DL-Met-hy-GlyH.HCl (9a) in 10 ml H_2O und versetzt mit 8.72 ml 1N-NaOH. Es erfolgt dabei eine Trübung, jedoch bildet sich kein Niederschlag. Man engt i.V. auf ca. 5 ml ein, läßt über Nacht bei 0°C stehen, filtriert den sich gebildeten weißen, schleimigen Niederschlag ab und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 2.44 g (79 %)

Der R_f-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2/1) 0.26.

10. N-(N^{α}-Z-N^{ε}BOC-L-LysyL)-N'-(Glycyl)-hydrazin (10)

a) Z-N^{α}-BOC-N^{ε}-L-Lys-hy-Gly-H.HCl (10a)

2.64 g (6.71 mMol) N^{α}-Carbobenzoxy-N^{ε}-BOC-L-Lysinhydrazid werden in 20 ml Eisessig gelöst und unter Rühren bei ZT. mit 0.678 g (6.71 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid versetzt. Danach wird i.V. entgast und nach 3 Minuten Rühren 6.71 ml 1N-HCl zugefügt. Die Lösung wird i.V. eingedampft und der ölige Rückstand aus Aceton/PeAe kristallisiert.

Ausbeute: 3.0g (91.7 %)
Smp.: 102 - 105°C

Die Substanz ist hygroskopisch. Der R_f-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.45. Zur Analyse wird aus Aceton/Petroläther kristallisiert und während 16 Stunden bei 70°C und 0.03 Torr über P_2O_5 getrocknet. Danach war der Schmelzpunkt 104 - 107°C.

$C_{21}H_{34}N_5O_6CL$		C	H	N
(488.342)	gef.	51.87	7.08	14.44
	ber.	51.68	7.02	14.42

b) Z-N$^{\alpha}$-BOC-N$^{\varepsilon}$-L-Lys-hy-GlyH (10)

Man löst 1 g (2.05 mMol) Z-N$^{\alpha}$-BOC-N$^{\varepsilon}$-L-Lys-hy-Gly-H.HCl in 5 ml H_2O, gibt bei ZT. 2.05 ml 1N-NaOH zu, wobei die Substanz als Oel ausfällt. Das Oel wird mit Chloroform extrahiert, die organische Phase mit wenig H_2O gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, i.V. eingedampft und im Exsikkator über P_2C_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.75 g (81 %) (rötliche Kristalle)

11. N-(Z-N$^{\alpha}$-Z-N$^{\varepsilon}$-L-Lysyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (11)

a) Z-N$^{\alpha}$-Z-N$^{\varepsilon}$-L-Lys-hy-GlyH.HCl (11a)

4.3 g (10.35 mMol) Diacarbobenzoxy-L-Lysinhydrazid werden in 50 ml Eisessig bei ZT. gelöst und unter Rühren mit 1.46 g (10.35 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid versetzt. Man läßt 5 Minuten rühren, entgast i.V., gibt 10.35 ml 1N-HCl zu und dampft danach i.V. ein. Der gelbliche Rückstand wird mit abs. EtOH aufgenommen und auf Zusatz von Äther kristallisiert. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Äther ausgewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 5.1 g (97 %)

Smp: 122 - 124°C

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.43. Zur Analyse wird aus EtOH/Ae kristallisiert und bei 75°C und 0.02 Torr während 16 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{24}H_{32}O_6N_5Cl$		C	H	N
(522.017)	gef.	54.93	6.29	13.23
	ber.	55.21	6.18	13.42

b) Z-N^{α}-Z-N^{ε}-L-Lys-hy-GlyH (11)

4.11 g (7.88 mMol) Z-N^{α}-Z-N^{ε}-L-Lys-hy-Gly-H.HCl werden in 10 ml H_2O gelöst und mit 7.88 ml 1N-NaOH versetzt. Sofort fällt ein rötlicher Niederschlag aus, der nach Stehen über Nacht bei 0°C abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet wird.

Ausbeute: 3.4 g (94 %) (rötlicher Niederschlag)

12. N-(Z-L-TryptophyL)-N'-(Glycyl)-hydrazin (12)

a) Z-L-Try-hy-Gly-H.HCl (12a)

2.9 g (8.24 mMol) Z-L-Try-hy werden in 40 ml Eisessig gelöst und unter Rühren bei ZT. mit 0.832 g (8.24 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid versetzt. Man läßt 5 Minuten rühren, entgast i.V. und gibt danach 9.24 ml 1N-HCl zu. Die Lösung wird i.V. eingedampft, der gelbliche Rückstand mit abs.EtOH aufgenommen und auf Zusatz von Äther/PeAe kristallisiert. Die weißen Kristalle werden nach mehrstündigem Stehen bei 0°C abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 3.1 g (80 %)

Smp.: 214 - 218°C

Die Substanz ist hygroskopisch. Ihr R_f-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.31. Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und während 16 Stunden bei 75°C und 0.02 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{21}H_{24}N_5O_4Cl$		C	H	N
(445.920)	gef.	56.34	5.59	15.59
	ber.	56.56	5.43	15.71

b) Z-L-Try-hy-Gly-H (12)

Man löst 2.2 g (4.94 mMol) Z-DL-Try-hy-Gly-H.HCl in 8 ml H_2O und gibt bei ZT. 4.94 ml 1N-NaOH zu. Sofort fällt ein weißer Niederschlag aus, der nach Stehen über Nacht bei 0°C abfiltriert, mit wenig kaltem H_2O nachgewaxchen und über P_2O_5 getrocknet wird.

Ausbeute: 1.9 g (94 %) (leicht rötliche Kristalle)

Der R_f-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.35.

13. N-(Z-L-Histidyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin (13)

Man löst 0.5 g (1.65 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-Histidinhydrazid bei ZT. unter Rühren in 20 ml Eisessig, versetzt mit 0.316 g (1.65 mMol) L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid, rührt 5 Minuten, entgast i.V., und dampft das Lösungsmittel unter vermindertem Druck ab. Versuche, den oeligen Rückstand zu kristallisieren, waren erfolglos. Versuche, das entsprechende Hydrochlorid zu kristallisieren, waren ebenfalls erfolglos. Man nimmt den Rückstand noch zweimal mit je 20 ml EtOH auf, dampft i.V. ab und trocknet die Substanz am HV über P_2O_5.

Ausbeute: 0.74 g (100 %) (gelbliches Oel)

Wie das DC zeigt, ist die Substanz fast rein. Ihr R_f-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOH 0.36.

14. N-(Z-L-Aspartyl-β-Benzylester)-N'-(Glycyl)-hydrazin (14)

a) Z-L-Asp(OBz)-hy-Gly-H.HCl (14a)

1.525 g (4.11 mMol) Carbobenzoxy-L-Asparaginsäure-α-hydrazid-β-benzylester werden in 20 ml Eisessig gelöst, mit 0.416 g Glycin-N-carboxyanhydrid versetzt, 5 Minuten bei ZT. gerührt, i.V. entgast und mit 4.11 ml 1N-HCl versetzt. Die Lösung wird i.V. eingedampft und der weiße Rückstand aus abs. EtOH kristallisiert.

Ausbeute: 1.61 g (84.6 %)

Smp.: ab 155°C Zersetzung

Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und 18 Stunden bei 65° und 0.05 Torr über P_2O_5 getrocknet.

		C	H	N
$C_{21}H_{25}O_6N_4Cl$ (464.920)	ber.	54.25	5.42	12.05
	gef.	54.24	5.57	11.95

b) Z-L-Asp(oBz)-hy-Gly-H (14)

1.395 g (3.0 mMol) werden in 15 ml H_2O gelöst und mit 3 ml 1N-NaOH bei ZT. versetzt. Sofort scheidet sich ein Oel ab, das nach einiger Zeit kristallisiert. Man läßt die Lösung noch 3 Stunden bei 0°C stehen, filtriert die abgeschiedenen, weißen Kristalle ab und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.97 g (75 %)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.47.

15. N-(Z-L-Asparaginyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin (15)

Man löst 0.668 g (2.38 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-Asparagin-hydrazid in 50 ml Eisessig, gibt bei ZT. unter Rühren 0.456 g (2.38 mMol) L-Phenyl-N-carboxyanhydrid zu, rührt 5 Minuten, entgast i.V., versetzt die Lösung mit 2.38 ml 1N-HCl und dampft i.V. ein. Der weiße Rückstand zeigt auf dem DC neben Diacyl als Hauptprodukt Nebenprodukte. (Das Diacyl .HCl durch mehrmaliges Umkristallisieren zu reinigen (EtOH/Ae) ist mit zu hohen Verlusten verbunden). Man löst das Diacyl .HCl in EtOH, dampft i.V. ein, trocknet den weißen Rückstand über P_2O_5, nimmt ihn danach in 15 ml H_2O auf, filtriert von weniger Ungelöstem ab und neutralisiert mit ca.0.33 ml Et_3N. Sofort fällt ein weißer Niederschlag aus, der nach mehrstündigem Stehen abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet wird.

Ausbeute: 0.75 g (74 %)

Smp.: 193 - 195°C

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.15. Zur Analyse wird aus H_2O umkristallisiert und während 20 Stunden bei 70°C und 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

	C	H	N
gef.	58.87	5.93	16.30
ber.	59.00	5.90	16.39

16. N-(Z-L-Glutaminyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (16)

a) Z-L-Glu(NH$_2$)-hy-Gly-H.HCl (16a)

1.7 g (5.72 mMol) Carbobenzoxy-L-Glutaminhydrazid werden in 30 ml Eisessig gelöst, unter Rühren bei ZT. mit 0.58 g (5.72 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid versetzt, entgast i.V., läßt noch 5 Minuten rühren, und fügt 5.72 ml 1N-HCl hinzu. Die Lösung wird i.V. eingedampft und aus abs.EtOH kristallisiert.

Ausbeute: 1.86 g (84.2 %)

Smp.: 161 - 162°C

Die Substanz ist stark hygroskopisch. Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und 18 Stunden bei 70°C und 0.05 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{15}H_{22}O_5N_5Cl$		C	H	N
(387.838)	gef.	46.30	5.99	17.86
	ger.	46.45	5.72	18.06

b) Z-L-Gly-hy-Gly-H (16)
NH$_2$

1.3 g (3.35 mMol) Z-L-Glu(NH$_2$)-hy-Gly-H.HCl werden in 5 ml H_2O gelöst, tropft dazu 3.35 ml 1N-NaOH und läßt das Gemisch über Nacht bei 0°C stehen. Es bildet sich ein rötlicher Niederschlag, der abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet wird.

Ausbeute: 1.04 g (88.5 %)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.12.

17. N-(Z-L-Glutamyl-γ-Methylester)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin (17)

a) Z-L-Glu(OMe)-hy-L-Phe-H.HCl (17a)

Man löst 0.238 g (0.77 mMol) Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-α-hydrazid-γ-Methylester in 10 ml Eisessig, gibt bei ZT. unter Rühren 0.147 g (0.77 mMol) L-Phe-N-carboxyanhydrid dazu, rührt 5 Minuten, entgast i.V., versetzt mit 0.77 ml 1N-HCl, dampft i.V. ein, nimmt mit EtOH auf und

dampft nochmals ein. Der weiße Rückstand wird mit 5 ml abs. EtOH aufgenommen, auf Zusatz von abs. Äther kristallisiert, mehrere Stunden bei $0^{\circ}C$ stehen gelassen, abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.32 g (85 %)

Smp.: 148 - 150°C

Die Substanz ist stark hygroskopisch.

Im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) ist der R_f-Wert 0.85.

Zur Analyse wird aus abs. EtOH/Ae kristallisiert und während 16 Stunden bei 60°C und 0.03 Torr über P_2O_5 getrocknet.

	C	H	N
gef.	56.14	6.18	11.49
ber.	56.04	5.93	11.37

b) Z-L-Glu(OMe)-hy-L-PheH (17)

Man löst 0.215 g (0.437 mMol) Z-L-Glu(OMe)-hy-L-Phe-H.HCl in 4 ml H_2O, gibt bei ZT. 0.066 ml Et_3N (1 Äquiv.) zu. Sofort fällt ein weißer Niederschlag aus, der nach mehrstündigem Stehen bei $0^{\circ}C$ abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet wurde.

Ausbeute: 0.17 g (86 %) (weiße, chromatogr. reine Kristalle)

18. N-(Z-L-Glutamyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin-hydrochlorid (18a)

Man löst 0.5 g (1.7 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-Glutaminsäure-α-hydrazid bei ZT. unter Rühren in 25 ml Eisessig, versetzt mit 0.324 g (1.7 mMol) L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid, rührt 5 Minuten, entgast i.V., gibt 1.7 ml 1N-HCl zu, dampft i.V. ab und nimmt den gelblichen Rückstand in abs. Alkohol auf. Nach kurzer Zeit fallen weiße Kristalle aus, die nach mehrstündigem Stehen bei $0^{\circ}C$ abfiltriert, mit wenig kaltem abs. EtOH nachgewaschen und über P_2O_5 getrocknet werden.

Ausbeute: 0.70 g (86 %) (weiße, chromatogr. reine Kristalle)

Smp.: 185 - 190°C

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.08. Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und während 18 Stunden bei 65°C und 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{22}H_{27}N_4O_6CL$		C	H	N
(478.925)	gef.	55.34	5.90	11.45
	ber.	55.16	5.68	11.72

19. N-(Z-L-Glutamyl)-N'-(L-Phenylalanyl)-hydrazin (19)

Man löst 0.5 g (1.7 mMol) Z-L-Glu-hy in 25 ml Eisessig, gibt bei ZT. unter
OH
Rühren (0.324 mMol) L-Phenylalanin-N-carboxy-anhydrid zu, läßt ca. 5 Minuten rühren, entgast am Vacuum und dampft danach i.V. ein. Der weiße Rückstand wird aus abs. EtOH kristallisiert und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.59 g (79 %)

Smp.: ab 135°C Zersetzung

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.08.

20. N-(Z-L-Prolyl)-N'-(Glycyl)-hydrazin (20)

a) Z-L-Pro-hy-Gly-H.HCl (20a)

4.98 g (18.9 mMol) Carbobenzoxy-L-Prolinhydrazid werden bei ZT. unter Rühren in 40 ml Eisessig gelöst, mit 1.91 g (18.9 mMol) Glycin-N-carboxyanhydrid versetzt, 5 Minuten rühren gelassen, i.V. entgast und mit 18.9 ml 1N-HCl versetzt. Die Lösung wird bei 40°C Badtemperatur i.V. eingedampft, und der gelbliche, oelige Rückstand aus abs. EtOH kristallisiert. Die weißen Kristalle werden nach mehrstündigem Stehen bei 0°C abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 5.05 g (74 %)

Smp.: 201 - 203°C

Die Substanz ist hygroskopisch. Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und während 20 Stunden bei 75°C und 0.05 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{15}H_{21}N_4O_4Cl$		C	H	N
(356.822)	gef.	50.29	5.92	15.97
	ber.	50.49	5.93	15.70

b) Z-L-Pro-hy-GlyH (20)

Man löst 3.568 g (10 mMol) Z-L-Pro-hy-Gly-H.HCl in 10 ml H_2O, gibt bei ZT. 10.0 ml 1N-NaOH zu. Sofort erfolgt eine Trübung, man läßt die Lösung über Nacht bei 0°C stehen, filtriert den ausgefallenen Niederschlag ab, wäscht mit wenig kalten H_2O nach und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 2.6 g (81 %) (leicht rötliche Kristalle)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.26.

21. N-(Z-Glycyl)-N'-(L-Prolyl)-hydrazin (21)

Man löst 1 g (4.48 mMol) Carbobenzoxy-glycinhydrazid in 40 ml Eisessig, versetzt mit 0.632 g (4.48 mMol) L-Prolin-N-carboxy-anhydrid, rührt 5 Minuten, entgast danach a.V. und dampft die Lösung i.V. ein. Der oelige, gelbliche Rückstand wird mit abs. EtOH aufgenommen und auf Zusatz von Äther/PeAe kristallisiert.

Ausbeute: 1.12 g (78 %)

Smp.: 140 - 142°C

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.20. Zur Analyse wird aus abs. EtOH/Ae/PeAe kristallisiert und während 18 Stunden bei 75°C und 0.06 Torr über P_2O_5 getrocknet. Danach ist der Schmelzpunkt 142 - 143°C.

$C_{15}H_{20}O_4N_4$		C	H	N
(320.357)	gef.	56.25	6.33	17.55
	ber.	56.24	6.29	17.49

22. N-(Z-Glycyl)-N'-(Sarcosyl)-hydrazin (22)

a) Z-Gly-hy-Sar-H.HCl (22a)

1.164 g (5.22 mMol) Carbobenzoxy-Glycinhydrazid werden in 30 ml Eisessig gelöst und unter Rühren bei ZT. mit 0.60 g (5.22 mMol) Sarcosin-N-carboxy-anhydrid, gelöst in 10 ml Eisessig, versetzt. Die Lösung wird 5 Minuten gerührt, i.V. entgast, mit 5.22 ml 1N-HCl versetzt und danach i.V. eingedampft. Der weiße Rückstand wird aus abs. EtOH kristallisiert, die Kristalle

mit wenig abs. EtOH ausgewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 1.45 g (85 %)

Smp.: ab 165° Zersetzung

Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und bei 65°C und 0.03 Torr während 18 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{13}H_{19}O_4N_4Cl$		C	H	N
(330.784)	gef.	47.47	6.00	16,83
	ber.	47.20	5.79	16.94

b) Z-Gly-hy-L-Sar-H (22)

1.054 g (3.10 mMol) Z-Gly-hy-Sar-H.HCl werden in 15 ml H_2O gelöst und bei ZT. mit 3.19 ml 1N-NaOH versetzt. Die Lösung wird auf ca. 10 ml i.V. eingeengt und bei 0°C über Nacht stehen gelassen. Es fallen leicht rötliche Kristalle aus, die abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet wurden.

Ausbeute: 0.72 g (78 %)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.21.

23. N-(Z-DL-Phenylalanyl)-N'-(Sarcosyl)-hydrazin (23)

a) Z-DL-Phe-hy-Sar-H.HCl (23a)

Man löst a g (3.19 mMol) Benzyloxycarbonyl-DL-Phenylalanin-hydrazid in 40 ml Eisessig, gibt unter Rühren bei ZT. 0.368 g (3.19 mMol) Sarcosin-N-carboxyanhydrid zu, rührt 5 Minuten, entgast am Vacuum, versetzt mit 3.19 ml 1N-HCl und dampft das Gemisch i.V. ein. Der feste Rückstand wird mit H_2O aufgenommen. Nach mehrstündigem Stehen fallen weiße, nadelförmige Kristalle aus, die abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet werden.

Ausbeute: 1.15 g (86 %)

Smp.: ab 172°C Zersetzung

Zur Analyse wird aus EtOH/H_2O kristallisiert und bei 65°C und 0.03 Torr während 18 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{20}H_{25}N_4C_4Cl$		C	H	N
(420.909)	gef.	57.25	6.25	13.32
	ber.	57.07	5.99	13.31

b) Z-DL-Phe-hy-Sar-H (23)

0.73 g (1.73 mMol) Z-Phe-hy-Sar-H.HCl werden in 40 ml H_2O unter leichtem Erwärmen gelöst. Dazu tropft man 1.73 ml 1N-NaOH, wobei sich ein weißer Niederschlag bildet. Man läßt bei 0°C noch 2 Stunden stehen, filtriert ab, wäscht mit wenig kaltem H_2O nach und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.64 g (96 %) (weiße, chromatogr., reine Kristalle)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.26.

24. N-(Z-DL-Threonyl)-N'-(Sarcosyl)-hydrazin (24)

a) Z-DL-Thre-hy-Sar-H.HCl (24a)

1 g (3.74 mMol) Carbobenzoxy-DL-Threoninhydrazid werden in 40 ml Eisessig gelöst und bei ZT. unter Rühren mit 0.431 g (3.74 mMol) Sarcosin-N-carboxyanhydrid versetzt. Es wird 5 Minuten rühren gelassen, i.V. entgast, 3.74 ml 1N-HCl zugegeben, die Lösung i.V. eingedampft und aus abs. EtOH kristallisiert.

Ausbeute: 1.2 g (86.3 %)

Smp.: ab 178°C Zersetzung

Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und bei 65°C und 0.06 Torr während 16 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{15}H_{23}O_5N_4Cl$		C	H	N
(373.830)	gef.	48.06	6.41	14.92
	ber.	48.06	6.19	14.95

b) Z-DL-Thre-hy-SarH (24)

0.74 g (1.98 mMol) Z-Thre-hy-Sar-H. HCl werden in 15 ml H_2O gelöst und mit 1.98 ml 1N-NaOH versetzt. Es tritt dabei eine rötliche Färbung ein, nach ca. 1 Stunde Stehen bei ZT. kristallisiert ein weißer Niederschlag aus. Man läßt über Nacht bei $0^{\circ}C$ stehen, filtriert ab und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.53 g (80.3 %)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.33.

C. Synthesen von N-Benzyloxycarbonyl-aminosäurehydraziden nach dem Verfahren der ADU.

I. Z-DL-Ala-Gly-hy (1b)

Man löst 0.9 g (3.05 mMol) Z-DL-Ala-hy-GlyH (1) in 180 ml DMA, gibt 55 g (3 Mol) Pivalinsäure zu, läßt 20 Stunden bei 40°C stehen und dampft das Lösungsmittel im HV bei 0.1 Torr und 55-60°C Badtemperatur ab. Der oelige Rückstand, der noch Pivalinsäure und Spuren von DMA enthält, wird mit 2N-Bicarbonatlösung neutralisiert, wobei sich ein weißer Niederschlag bildet. Man nimmt mit heißen H_2O auf, filtriert von wenig Unlöslichem ab, läßt über Nacht bei 0°C stehen, filtriert die ausgefallenen weißen Kristalle ab und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.56 g (62.5 %)
Smp.: 107 - 113°C

Die Substanz, die chromatographisch fast rein ist, wird aus H_2O umkristallisiert. Danach ist der Schmelzpunkt 115-116°C. Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch 0.3

Zur Analyse wird aus H_2O kristallisiert und während 12 Stunden bei 60°C und 0.04 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{13}H_{18}N_4O_4$		C	H	N
(294.319)	gef.	53.26	6.37	18.79
	ber.	63.05	6.16	19.04

II. Z-DL-Phe-Gly-hy (2b)

Man löst 1 g (2.7 mMol) Z-DL-Phe-hy-GlyH (2) in 200 ml DMA, gibt 61.2 g (3 Äquivalente) Pivalinsäure zu, läßt 22 Stunden bei 40°C stehen, dampft danach das Lösungsmittel am HV bei einer Badtemperatur von 60°C ab und neutralisiert den öligen Rückstand mit 10 %-$KHCO_3$. Dabei scheidet sich ein weißer Niederschlag ab, der aus abs. Alkohol umkristallisiert wird

Ausbeute: 0.63 g (63 %)
Smp.: 158 - 160°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.59).

Zur Analyse wird aus Alkohol kristallisiert und bei 60°C und 0.01 Torr während 12 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{19}H_{22}O_4N_4$		C	H	N
(370.417)	gef.	61.86	5.93	15.21
	ber.	61.60	5.98	15.12

III. Z-DL-Leu-Gly-hy-Sal (3c)

Man löst 1 g (2.98 mMol) Z-DL-Leu-hy-Gly-H (3) in 10 ml Eisessig, verdünnt mit 190 ml DMA, läßt 23 Stunden bei 40°C stehen und destilliert im HV bei 0.4 Torr und 55°C Badtemperatur das Lösungsmittel ab. Versuche, aus dem öligen Rückstand, nach Neutralisieren mit $KHCO_3$, das Hydrazid zu erhalten, waren erfolglos.

Man nimmt den öligen Rückstand mit 10 ml EtOH auf, versetzt mit 0.398 g (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd, wobei sich sofort ein gelber Niederschlag bildet. Man läßt 2 Stunden bei 40°C, danach über Nacht bei 0°C stehen, filtriert den gelblichen Niederschlag ab, wäscht mit abs. EtOH nach und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.88 g (67.5 %)
Smp.: 178 - 180°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.80). Die Flecken auf dem DC fluoreszieren im UV sehr stark.

Zur Analyse wird aus EtOH/H_2O kristallisiert und während 6 Stunden bei 70°C und 0.02 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{23}H_{28}O_5N_4$		C	H	N
(440.509)	gef.	62.72	6.55	12.62
	ber.	62.71	6.41	12.72

IV. Z-DL-Ser-Gly-hy-Sal (4c)

Man löst 1 g (3.22 mMol) in 10 ml Eisessig, verdünnt mit 190 ml Dioxan, läßt 23 Stunden bei 40°C stehen, fügt 0.433 g (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd zu, läßt 3 Stunden bei 40°C stehen, engt die Lösung i.V. auf ca. 20 ml ein und läßt über Nacht bei 0°C stehen. Es fallen weiße Nadeln aus, die abfiltriert, mit wenig kaltem EtOH nachgewaschen und über P_2O_5 getrocknet werden.

Ausbeute: 0.95 g (71 %)

Smp.: 177 - 178°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.50). Die Flecken fluoreszieren im UV sehr stark. Zur Analyse wird aus EtOH/H_2O kristallisiert und während 18 Stunden bei 72°C und 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{20}H_{22}O_6N_4$		C	H	N
(414.428)	gef.	57.89	5.53	13.52
	ber.	57.96	5.35	13.52

V. Z-DL-Thr-Gly-hy (5b)

Man löst 1 g (2.96 mMol) Z-DL-Thr-hy-GlyH (5) in 190 ml DMA, fügt 10 ml Eisessig hinzu und läßt bei 40°C 5 Tage stehen. Nach dieser Zeit ist fast alles Diacyl umgelagert, jedoch haben sich neben Z-DL-Thr-Gly-hy ziemlich Nebenprodukte gebildet, die mit Ausnahme von Diketopiperazin weiter nicht untersucht wurden. Man destilliert das Lösungsmittel am HV bei 0.2 Torr und einer Badtemperatur von 55 - 60°C, neutralisiert den öligen Rückstand mit einigen Tropfen 10 % $KHCO_3$, nimmt das Oel mit 10 ml MeOH auf und tropft H_2O zu. Dabei bildet sich ein weißer Niederschlag, der nach Stehen über Nacht abfiltriert, mit H_2O ausgewaschen und über P_2O_5 getrocknet wird.

Ausbeute: 0.52 g (52 %)

Smp.: 163 - 176°C

Die Substanz ist chromatographisch nicht ganz rein. Sie wird noch zweimal aus MeOH/H_2O umkristallisiert.

Ausbeute: 0.30 g (30 %)

Smp.: 181 - 183°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Beide Substanzen zeigen im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identische R_f-Werte (0.42). Zur Analyse wird aus MeOH/H_2O kristallisiert und während 17 Stunden bei 68°C und 0.04 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{14}H_{20}N_4O_5$ (324.346)		C	H	N
	gef.	52.01	6.30	17.23
	ber.	51.84	6.22	17.28

VI. Z-DL-Allothr-Gly-hy (6b)

Man führt die Umlagerung von Z-DL-Allothr-hy-GlyH (6) analog der beschriebenen Umlagerung des Threoninderivates durch. Die Reinausbeute an Z-DL-Allothr-Gly-hy beträgt 40 %.

Smp.: 199 - 200°C

Zur Analyse wird aus MeOH/H_2O kristallisiert und während 16 Stunden bei 65°C und 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{14}H_{20}N_4O_5$ (324.346)		C	H	N
	gef.	51.78	6.37	17.11
	ber.	51.84	6.22	17.28

VII. Z-L-Tyr-Gly-hy (7b)

Man löst 1.0 g (2.58 mMol) Z-L-Tyr-hy-Gly-H (7) in 10 ml Eisessig, verdünnt mit 190 ml Dioxan, läßt 25 Stunden bei 40°C stehen, engt i.V. auf ca. 40 ml ein, lyophylisiert den Rest, nimmt den weißen Rückstand in 10 ml MeOH auf, tropft H_2O zu, wobei Kristallisation eintritt, läßt die Lösung über Nacht bei 0°C stehen, filtriert den gelblichen Niederschlag ab, wäscht mit H_2O nach und trocknet im Exsikkator über P_2O_5.

Ausbeute: 0.53 g (53 %) (gelbliche, chromatogr. reine Kristalle)

Smp.: 182 - 186°C

Nach Umkristallisieren aus MeOH/H_2O beträgt der Smp. 184 - 187°C. Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.52).

Zur Analyse wird aus MeOH/H_2O kristallisiert und während 16 Stunden bei 65°C und 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{19}H_{22}O_5N_4$		C	H	N
(386.417)	gef.	59.28	5.89	14.37
	ber.	59.06	5.74	14.50

VIII. S-BZ-N-Z-L-Cys-Gly-hy (8b)

Man löst 0.45 g (1.0 mMol) S-Bz-N-Z-L-Cys-hy-GlyH (8) in 90 ml DMA, fügt 27.364 g (3 Mol) Pivalinsäure zu, läßt 25 Stunden bei 40°C stehen, dampft das Lösungsmittel am HV ab und neutralisiert den oeligen Rückstand mit 2N-Bicarbonat-Lösung. Dabei bildet sich ein weißer Niederschlag, der aus abs. Alkohol umkristallisiert wird.

Ausbeute: 0.3 g (66 %)
Smp.: 142°C [1]

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.65).

Zur Analyse wird aus Alkohol kristallisiert und während 15 Stunden bei 70°C und 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{20}H_{24}O_4N_4S$		C	H	N
(416.510)	gef.	57.84	5.97	13.39
	ber.	57.67	5.80	13.45

IX. Z-DL-Met-Gly-hy (9b)

Man löst 1 g (2.82 mMol) Z-DL-Met-hy-GlyH (9) in 10 ml Eisessig, verdünnt mit 190 ml Dioxan, läßt 21 Stunden bei 40°C stehen, engt das Lösungsmittel i.V. auf ca. 40 ml ein und lyophylisiert den Rest. Den weißen Rück-

1) ein erster Smp. liegt bei 119°, erhitzt man langsam weiter, kristallisiert das Geschmolzene wieder und schmilzt dann bei 142°.

stand nimmt man mit 10 ml MeOH auf, tropft H_2O zu, wobei sich ein weißer Niederschlag bildet, läßt über Nacht bei 0^oC stehen, filtriert ab, wäscht mit H_2O nach und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.77 g (77 %)

Smp.: 114 - 115 °C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.55).

Zur Analyse wird aus MeOH/H_2O kristallisiert und während 14 Stunden bei 60^oC und 0.05 Torr über P_2O_5 getrocknet. Danach ist der Schmelzpunkt 115 - 116 °C.

		C	H	N
$C_{15}H_{22}N_4O_4S$	gef.	50.64	6.37	15.59
(354.439)	ber.	50.84	6.26	15.81

X. N^{α}-Z-N^{ε}-BOC-L-Lys-Gly-hySal (10c)

Man löst 0.75 g (1.6 mMol) N^{α}-Z-N^{ε}-BOC-L-Lys-hy-GlyH (10) in 7.5 ml Eisessig verdünnt mit 143 ml Dioxan, läßt 36 Stunden bei 40^oC stehen, engt i.V. auf ca. 40 ml ein und lyophylisiert den Rest. Der gelbliche Rückstand wird mit 10 ml EtOH aufgenommen, mit 0.22 g (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd versetzt und 5 Stunden bei 40^oC stehen gelassen. Es fallen schwach gelbliche Kristalle aus. Auf Zusatz von wenig H_2O tritt vermehrte Kristallisation ein. Nach mehrstündigem Stehen bei 0^oC wird abfiltriert, mit wenig kaltem EtOH nachgewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.71 g (77 %) (leicht gelbliche Kristalle)

Smp.: 175 - 177 °C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.90).

Zur Analyse wird aus EtOH/H_2O kristallisiert und während 18 Stunden bei 70^o und 0.03 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{28}H_{37}O_7N_5$				
(555.644)	gef.	60.77	6.76	12.45
	ber.	60.52	6.71	12.61

XI. N^{α}-Z-N^{ε}-Z-L-Lys-Gly-hy-Sal (11c)

Man löst 1 g (1.9 mMol) N^{α}-Z-N^{ε}-L-Lys-hy-GlyH (11) in 10 ml Eisessig, verdünnt mit 190 ml Dioxan, läßt 48 Stunden bei 40°C stehen, engt i.V. auf ca. 40 ml ein und lyophylisiert den Rest. Der weiße Rückstand wi mit 10 ml abs. EtOH aufgenommen und mit 0.29 g (1.1 Äquiv.) Salicylalde hyd versetzt, bei 40°C während 5 Stunden und danach über Nacht bei 0°C s hen gelassen. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert, mit kaltem abs. Et nachgewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.9 g (80.5 %)

Smp.: 162 - 164°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/ MeOH (2:1) identisch (0.91).

Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und während 16 Stunden bei 70°C und 0.02 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{31}H_{35}C_7N_5$		C	H	N
(589.661)	gef.	63.18	6.05	11.65
	ber.	63.14	5.98	11.88

XII. Z-L-Try-Gly-hy-Sal (12c)

Man löst 0.8 g (1.95 mMol(Z-DL-Try-hy-GlyH (12) in 8ml Eisessig, verdünnt mit 152 ml DMA, läßt 29 Stunden bei 40°C stehen und dampft das Lösungsmittel im HV bei 0.1 Torr und 55 - 60°C Badtemperatur ab. Aus dem öligen Rückstand, der chromatographisch nicht rein ist, das Hydrazi durch Kristallisation zu erhalten, gelingt nicht. Man nimmt daher das Oel 5 ml EtOH auf, versetzt mit 0.262 g (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd, wobei si sofort eine Trübung bildet, läßt 5 Stunden bei 40°C und über Nacht bei 0°C stehen. Es scheiden sich gelbliche Kristalle ab, die abfiltriert, mit wenig abs. EtOH nachgewaschen und über P_2O_5 getrocknet werden.

Ausbeute: 0.51 g (51 %) (gelbe Kristalle)

Smp.: 186 - 188°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.80). Die Flecken des DC fluoreszieren im UV sehr stark. Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und während 18 Stunden bei 70°C und 0.06 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{28}H_{27}O_5N_5$		C	H	N
(513.564)	gef.	65.61	5.48	13.63
	ber.	65.48	5.30	13.64

XIII. Z-L-Hiy-L-Phe-hy (13b)

0.7 g (1.55 mMol) Z-L-His-hy-L-Phe-H (13) (als Oel) werden in 3.5 ml Eisessig und 67 ml abs. Dioxan gelöst und bei 40°C stehen gelassen. Das DC zeigt, daß nach 24 Stunden alles umgelagert ist. Es wird i.V. bei 40°C Badtemperatur auf ca. 40 ml eingeengt und die verbleibende Lösung lyophylisiert. Der weiße Rückstand wird aus abs. EtOH kristallisiert, nach mehrstündigem Stehen bei 0°C abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.68 g (97.1 %)

Smp.: 199 - 201°C

Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.60).
Der MSmp. zeigt keine Depression. Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und während 22 Stunden bei 60°C und 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{23}H_{26}N_6O_4$		C	H	N
(450.509)	gef.	61.48	6.11	18.42
	ber.	61.32	5.82	18.66

XIV. Z-L-Asp(OBz)-Gly-hy (14b)

Man löst 0.5 g Z-L-Asp(OBz)-hy-GlyH (14) in 5 ml Eisessig verdünnt mit 100 ml Dioxan, läßt bei 40° während 48 Stunden stehen, engt i.V. auf ca. 40 ml ein und lyophylisiert die verbleibende Lösung. Der weiße Rückstand wird mit 10 ml EtOH aufgenommen, mit H_2O bis zur Trübung versetzt und über Nacht bei 0°C stehen gelassen. Der ausgefallene weiße Niederschlag

wird abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.29 g (59 %)

Smp.: 160 - 164°C

Die Substanz zeigt Ninhydrin negative, jedoch Toluidin und Tollens positive Reaktionen.

Der R_f-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.73.

Zur Analyse wird aus EtOH/H_2O kristallisiert und während 16 Stunden bei 60°C und 0.04 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{21}H_{24}O_6N_4 1/2H_2O$		C	H	N
	gef.	58.11	5.54	12.76
	ber.	57.66	5.72	12.81

XV. Z-L-Glu(NH$_2$)-Gly-hy-Sal (16c)

Man löst 1 g (2.85 mMol) Z-L-Glu(NH$_2$)-hy-GlyH (16) in 10 ml Eisessig, verdünnt mit 190 ml DMA, läßt 34 Stunden bei 40°C stehen und dampft das Lösungsmittel am HV bei einer Badtemperatur von 50 - 60°C ab. Den öligen Rückstand nimmt man mit 10 ml EtOH auf, versetzt mit 0.41 g (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd und läßt 5 Stunden bei 40°C danach über Nacht bei 0°C stehen. Die abgeschiedenen gelblichen Kristalle werden abfiltriert, mit wenig kaltem EtOH ausgewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.79 g (61 %)

Smp.: 210 - 212°C

Die Substanz ist hygroskopisch. Der MSmp. zeigt keine Depression. Die Rf-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.80). Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und während 18 Stunden bei 70°C und 0.1 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{22}H_{25}O_6N_5$		C	H	N
(455.482)	gef.	57.71	5.74	15.15
	ber.	58.01	5.53	15.38

XVI. Z-L-Glu(OMe)-L-Phe-hy (17b)

Man löst 0.2 g (0.44 mMol) Z-L-Glu(OMe)-hy-L-PheH (17) in 1 ml Eisessig, verdünnt mit 19 ml Dioxan, läßt bei 40°C während 24 Stunden stehen und lyophylisiert die Lösung. Die weiße Substanz ist chromatographisch fast rein; sie zeigt Ninhydrin negative, Toluidin und Tollens positive Reaktionen. Zur Identifizierung nimmt man die Substanz in 10 ml MeOH auf, gibt 4.4 ml 0.1 N-AnOH zu, läßt 30 Minuten bei ZT. stehen und versetzt danach mit 4.4 ml 0.1 N-HCl. Man dampft die Lösung i.V. ein, nimmt den Rückstand mit abs. EtOH auf, filtriert von Ungelöstem ab und läßt bei 0°C über Nacht stehen. Der ausgefallene, weiße Niederschlag wird abfiltriert mit EtOH ausgewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.14 g (72 %)

Smp.: 179 - 181°C

Die R_f-Werte der isolierten Substanz und jene von (18b) sind identisch. Sie betragen im: System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.08

System 70 % Propanol 0.65

Der MSmp. zeigt keine Depression.

XVII. Z-L-Glu(OH)-L-Phe-hy (19b)

Man löst 1.0 g (2.2 mMol) Z-L-Glu(OH)-hy-L-Phe-H (19) in 5 ml Eisessig, gibt 95 ml Dioxan zu, läßt das Gemisch bei 40°C stehen und chromatographiert von Zeit zu Zeit. Dabei zeigt sich, daß nach 11 Stunden alles Diacyl umgelagert ist. Man dampft i.V. auf ca. 40 ml ein, lyophylisiert den Rest, kristallisiert den verbleibenden, weißen Rückstand aus abs. EtOH und trocknet die Kristalle über P_2O_5.

Ausbeute: 0.90 g (90 %) (weiße, chromatogr. reine Kristalle)

Smp.: 179 - 181°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte in den Systemen $HCCl_3$/MeOH (2:1) und 70 % EtOH sind identisch.

Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und während 18 Stunden bei 60°C und 0.01 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{22}H_{26}O_6N_4$		C	H	N
(442.482)	gef.	59.80	6.05	12.72
	ber.	59.72	5.92	12.66

XVIII. Z-L-Pro-Gly-hy (20b)

Man löst 1g (3.12 mMol) Z-L-Pro-hy-Gly-H (20) in 10 ml Eisessig, verdünnt mit 190 ml Dioxan, läßt 20 Stunden bei 40°C stehen, engt i.V. auf ca. 40 ml ein und lyophylisiert den Rest. Der weiße Rückstand wird mit abs. EtOH aufgenommen, auf Zusatz von Äther kristallisiert, über Nacht bei 0°C stehen gelassen, abfiltriert, mit abs. EtOH/Ae (1:1) nachgewaschen und im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.68 g (68 %) (weiße, nadelförmige Kristalle)
Smp.: 129 - 142°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) identisch (0.47).

Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und während 14 Stunden bei 70°C und 0.02 Torr über P_2O_5 getrocknet. Danach ist der Schmelzpunkt 141-142°C.

$C_{15}H_{20}N_4O_4$		C	H	N
(320.357)	gef.	56.04	6.37	17.52
	ber.	56.24	6.29	17.49

XIX. Z-Gly-L-Pro-hy (21b)

Man löst 0.28 g (0.9 mMol) Z-Gly-hy-L-ProH (21) in 1.4 ml Eisessig, verdünnt mit 27 ml Dioxan, läßt 21 Stunden bei 40°C stehen, lyophylisiert die Lösung, nimmt den Rückstand mit 15 ml abs. EtOH auf und versetzt mit 0.09 g (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd. Man läßt die Lösung bei 40°C 7 Stunden und über Nacht bei 0°C stehen, filtriert die ausgefallenen, weißen Kristalle ab, wäscht mit wenig kaltem abs. EtOH nach und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.30 g (83 %)

Smp.: 155 - 158°C

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.90. Die Substanz ist Ninhydrin negativ, Toluidin und Tollens positiv.

Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und während 16 Stunden bei 75° und 0.03 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{22}H_{24}O_5N_4$ (424.466)		C	H	N
	gef.	62.50	5.86	13.36
	ber.	62.25	5.69	13.20

D. Synthesen der Vergleichsverbindungen

I. Z-DL-Ala-Gly-hy (1b)

Z-DL-Ala-Gly-Etester wurde nach der Vorschrift von Boissonas[1] hergestellt (Ausbeute 63 %), und die Hydrazinolyse nach den Angaben von Zahn[2] durchgeführt (Ausbeute 71 %) Smp. 116°C.

II. Z-DL-Phe-Gly-hy (2b)

Man löst 3.003 g (10 mMol) Z-DL-Phenylalanin in 50 ml abs. $HCCl_3$, kühlt auf -5°C ab, fügt 1.40 ml (10 mMol) Et_3N und 0.955 ml (10 mMol) Chlorameisensäureäthylester zu, läßt 10 Minuten rühren, versetzt danach mit einer auf 0°C gekühlten Lösung von 1.255 g (10 mMol) Glycin-Methylesterhydrochlorid und 1.40 ml (10 mMol) Et_3N in 30 ml abs. $HCCl_3$, läßt 20 Minuten bei -5°C und weitere 3 Stunden bei ZT. rühren. Das ausgefallene Triaethylaminhydrochlorid wird abfiltriert, das Lösungsmittel i.V. abgedampft, der verbleibende ölige Rückstand in Essigester aufgenommen, mit 2N-HCl, 2N-Sodalösung und H_2O ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und die Lösung i.V. eingedampft. Man versetzt noch zweimal mit je 20 ml EtOH und dampft i.V. ein (möglichst vollständiges Entfernen des Essigesters).

Ausbeute: 3.2 g (86.5 %) (Oel)

Der R_f-Wert des chromatographisch reinen Oeles beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.89. Das Oel wird ohne daß man versucht zu kristallisieren, zum Hydrazid weiterverarbeitet. Man löst 3.2 g (8.64 mMol) Z-DL-Phe-Gly-OMethylester in 20 ml abs. MeOH, gibt 1.31 g (3 Äquiv.) Hydrazinhydrat zu, läßt über Nacht bei 40°C und einige Stunden bei 0°C stehen. Die ausgefallenen, weißen Kristalle werden abfiltriert und mit MeOH/Ae (1:1) ausgewaschen und aus EtOH umkristallisiert.

Ausbeute: 2.55 g (80 %)

Smp.: 159 - 160°C

1) R.A. Boissonas, Helv. 34, 874 (1951)
2) H. Zahn, Ann. Chem. 604, 62 (1957)

Der R_f-Wert der chromatographisch reinen Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.59.

III. Z-DL-Leu-Gly-hy-Sal (3c)

a) Z-DL-Leu-Gly-PEthylester wird analog der Vorschrift der Ala-Verbindung hergestellt. Die Rohausbeute (Smp.: 80-85°C) beträgt 80 %. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Essigester/PeAe (Smp.: 90-91°C) beträgt die Ausbeute noch 71 %. Der R_f-Wert des chromatographisch reinen Esters ist im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.62.

b) Z-DL-Leu-Gly-hydrazid

Man löst 1.8 g (5.36 mMol) Z-DL-Leu-Gly-OEthylester in 20 ml abs. EtOH, fügt 0.81 g (3 Äquiv.) Hydrazinhydrat zu, läßt über Nacht bei 40°C stehen und dampft danach i.V. ein. Der ölige Rückstand wird nochmals in EtOH aufgenommen, i.V. eingedampft und im Exsikkator über konz. H_2SO_4 getrocknet.

Ausbeute: 1.8 g (Oel)

Das Oel ist chromatographisch fast rein. Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.43.

c) Z-DL-Leu-Gly-hy-Sal

Man löst 1 g (2.97 mMol) Z-DL-Leu-Gly-hy in 5 ml abs. EtOH, gibt 0.4 g (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd zu, läßt über Nacht bei 40°C, danach noch einige Stunden bei 0°C stehen, filtriert den sich gebildeten, gelblichen Niederschlag ab, wäscht mit abs. EtOH aus und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 1.1 g (77 %) (gelbliche, chromatogr. reine Kristalle)

IV. Z-DL-Ser-Gly-hy-Sal (4c)

a) Z-DL-Ser-Gly-hydrazid

Z-DL-Ser-Gly-OEthylester wurde nach der Vorschrift von Zahn hergestellt (Ausbeute 62 %). Nach dem gleichen Autor wurde die Hydrazinolyse

durchgeführt (Ausbeute 84 %) Smp. 184-186°C.

b) Z-DL-Ser-Gly-hy-Sal

Man löst 1 g (3.22 mMol) Z-DL-Ser-Gly-hydrazid in 20 ml abs. EtOH, gibt 0.422 g (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd zu, läßt über Nacht bei 40°C stehen, versetzt mit H_2O bis zur Trübung der Lösung, läßt einige Stunden bei 0°C stehen, filtriert den ausgefallenen Niederschlag ab, wäscht mit wenig MeOH/H_2O nach und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 1.15 g (86.5 %) (weiße, chromatogr. reine Nadeln)

Smp.: 177 - 179°C

V. Z-DL-Thr-Gly-hy (5b)

a) Z-DL-Thr-Gly-OMethylester

Man gibt zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 5.3 g (20.0 mMol) Z-DL-Thr-hydrazid in 80 ml H_2O + 30 ml 1N-HCl, 2.4 g $NaNO_2$ gelöst in 10 ml H_2O, rührt ca. 5 Minuten, extrahiert danach mit Essigester, wäscht mit gesättigter NaCl-Lösung neutral und trocknet über $MgSO_4$.

Diese Azidlösung gibt man zu einer während 5 Minuten bei 0°C gerührten Lösung aus 2.55 g (20 mMol) Glycin-Methylesterhydrochlorid in 10 ml Methylenchlorid und 2.8 ml (1 Äquiv.) Et_3N, rührt 5 Stunden bei 0°C, läßt über Nacht bei 0°C stehen, dampft die Lösung i.V. ein, nimmt mit Essigester auf, wäscht jeweils dreimal mit ca. 10 ml 2N-HCl, 10 ml 10 % $KHCO_3$ und 10 ml gesättigter Kochsalzlösung, trocknet über $MgSO_4$ und dampft die Lösung i.V. ein.

Ausbeute: 3.2 g (50 %)

Der R_f-Wert des chromatographisch reinen Oels beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.63. Das Oel wurde, ohne Versuch zur Kristallisation, zum Hydrazid weiterverarbeitet.

b) Z-DL-Thr-Gly-hydrazid

Man löst 3.2 g (9.86 mMol) Z-DL-Thr-Gly-OMethylester in 20 ml abs. MeOH, versetzt mit 1.49 g (3 Äquiv.) Hydrazinhydrat, läßt bei 40°C übe

Nacht stehen, wobei weiße Kristalle ausfallen. Man läßt noch einige Stunden bei $0^{\circ}C$ stehen, filtriert ab, wäscht mit kaltem H_2O nach und trocknet über konz. H_2SO_4.

Ausbeute: 2.9 g (90.5 %)

Smp.: 165 - 174°C

Die Substanz ist chromatographisch noch nicht ganz rein. Sie wird nochmals aus MeOH/H_2O umkristallisiert und über konz. H_2SO_4 getrocknet.

Ausbeute: 2.3 g (72 %) (weiße, chromatogr. reine Kristalle)

Smp.: 180 - 182°C

VI. Z-DL-Allothr-Gly-hy (6b)

(6b) wurde genau nach der für das Threoninderivat beschriebenen Vorschrift hergestellt. Die Ausbeuten sind etwa gleich wie bei der Threoninverbindung; die R_f-Werte sind in den Systemen $HCCl_3$/MeOH (2:1), $HCCl_3$/MeOH (10:1), 70 % Propanol identisch. Der Schmelzpunkt vom Z-DL-Allothr-Gly-hy beträgt 199-200°C.

VII. Z-L-Try-Gly-hy (7b)

a) Z-L-Tyr-Gly-OMethylester

Zu einer Lösung von 7.88 g (25.0 mMol) Z-L-Tyrosin, 3.14 g (25.0 mMol) Glycin-Methylesterhydrochlorid und 3.50 ml (25.0 Mol) Et_3N in 150 ml $HCCl_3$ gibt man unter Kühlung 6.18 g (30 mMol) Dicyclohexyl-Carbodiimid in 10 ml $HCCl_3$. Sofort scheidet sich Harnstoff ab; man läßt über Nacht bei $0^{\circ}C$ und weitere 12 Stunden bei ZT. stehen, filtriert ab, wäscht mit $HCCl_3$ nach, dampft die Lösung i.V. ein, nimmt den öligen Rückstand in Essigester auf, wäscht mit H_2O, 1N-HCl, 10 % KHCO, H_2O, trocknet über $MgSO_4$ und dampft die Lösung i.V. ein. Der gelbliche, feste Rückstand wird in Essigester aufgenommen, auf Zusatz von Petroläther kristallisiert, über Nacht bei $0^{\circ}C$ stehen gelassen, abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 7.8 g (80.5 %)

Der R_f'-Wert des chromatographisch reinen Esters beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.78.

b) Z-L-Tyr-Gly-hydrazid

Man löst 3.9 g (9.6 mMol) Z-L-Tyr-Gly-OMethylester in 25 ml abs. MeOH, gibt 1.46 g (3 Äquiv.) Hydrazinhydrat hinzu, läßt über Nacht bei 40°C stehen, dampft i.V. ein, nimmt mit 10 ml MeOH auf, versetzt mit H_2O bis zur Trübung, läßt über Nacht bei 0°C stehen, filtriert den leicht gelblichen Niederschlag ab, wäscht mit H_2O nach und trocknet über konz. H_2SO_4.

Ausbeute: 3.02 g (77 %)

Smp.: 174 - 182°C

Die Substanz ist chromatographisch nicht ganz rein, sie wird nochmals aus MeOH/H_2O kristallisiert.

Ausbeute: 2.3 g (59 %)

Smp.: 183 - 186°C

VIII. S-Bz-N-Z-L-Cys-Gly-hy (8b)

S-Bz-N-Z-L-Cys-Gly-OEt wurde nach der Vorschrift von S. Goldschmidt[1] mit einer Ausbeute noch 65 % erhalten. Die Hydrazinolyse des Esters wurde nach der Vorschrift von Lautsch[2] bei 0°C durchgeführt; die Ausbeute an Hydrazid beträgt 55 %

Smp.: 142° ⊗

Das Hydrazid durch fünfstündiges Kochen des Esters in Alkohol gemäß der Vorschrift von Hooper[3] herzustellen gelang nicht.

⊗ ein erster Schmelzpunkt ist bei 119°C.

---

1) S. Goldschmidt, Chem. Ber. 86, 1119 (1953)

2) W. Lautsch, J.J. Krage, Chem. Ber. 89, 737 (1956)

3) K.C. Hooper, H.N. Rydon, J.Chem.Soc., 1956, 3148

IX. Z-DL-Met-Gly-hy (9b)

a) Z-DL-Met-Gly-Ester

Man löst 18 g (63.6 mMol) Z-DL-Methionin in 120 ml abs. $HCCl_3$, kühlt auf -10°C ab, gibt 8.91 ml (1 Äquiv.) Et_3N und 6.15 ml Chlorameisensäureethylester zu und rührt 10 Minuten. Dazu gibt man 8.90 g (63.6 mMol) Glycinäthylester-Hydrochlorid und 8.91 ml Et_3N in 50 ml $HCCl_3$, läßt 1 Stunde bei 15°C und danach noch 3 Stunden bei ZT. rühren, dampft das $HCCl_3$ i.V. ab, nimmt den öligen Rest in Essigester auf, wäscht mit H_2O, 2N-HCl, 10 % $KHCO_3$, H_2O, trocknet über Na_2SO_4, dampft das Lösungsmittel i.V. ein, nimmt den öligen Rückstand wieder in Essigester auf und kristallisiert auf Zusatz von Petroläther.

Ausbeute: 16 g (74 %)

Smp.: 72 - 75°C

Der R_f-Wert des chromatographisch reinen Esters beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.73.

b) Z-DL-Met-Gly-hy

Man löst 2 g (5.65 mMol) Z-DL-Met-Gly-OEt in 20 ml abs. MeOH, gibt 0.852 ml (3 Äquiv.) Hydrazinhydrat zu, nimmt mit 10 ml MeOH auf, tropft H_2O zu bis zur Trübung und läßt über Nacht bei 0°C stehen. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert, mit H_2O ausgewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 1.35 g (67 %)

Smp.: 115 - 116°C

X. Z-N$^{\alpha}$-BOC-N$^{\varepsilon}$-L-Lys-Gly-hy-Sal (10c)

Man löst 2.29 g (6.03 mMol) Z-N$^{\alpha}$-BOC-N$^{\varepsilon}$-L-Lysin in 35 ml abs. $HCCl_3$, kühlt auf -5°C ab, fügt 0.846 ml (6.03 mMol) Et_3N und 0.582 ml (6.03 mMol) Chlorameisensäureäthylester zu, läßt 10 Minuten rühren, versetzt danach mit einer auf 0°C gekühlten Lösung von 0.758 g (6.03 mMol) Glycin-Methylesterhydrochlorid und 0.846 ml Et_3N in 20 ml abs. $HCCl_3$ und läßt 20 Minuten bei -5°C und weitere 3 Stunden bei ZT. rühren. Das ausgefallene Tri-

äthylaminhydrochlorid wird abfiltriert, das Lösungsmittel i.V. abgedampft, der verbleibende oelige Rückstand in Essigester aufgenommen, mit 2N-Citronensäure, 2N-$KHCO_3$ und H_2O ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und die Lösung i.V. eingedampft. Man versetzt noch zweimal mit je 20 ml EtOH und dampft i.V. ein.

Ausbeute: 1.95 g (72 %) (Oel)

Der R_f-Wert des chromatographisch reinen Oeles beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.82. Das Oel wird direkt zum Hydrazid weiterverarbeitet. Man löst 1.3 g (2.88 m Mol) Z-N^{α}-BOC-N^{ε}-L-Lys-Gly-OMethylester in 20 ml abs. EtOH, fügt 0.433 g (3 Äquiv.) Hydrazinhydrat zu, läßt über Nacht bei 40°C stehen und dampft danach die Lösung i.V. ein. Der oelige Rückstand wird zweimal mit 10 ml H_2O versetzt und i.V. eingedampft. Der oelige Rückstand wird im Exsikkator über konz. H_2SO_4 getrocknet.

Ausbeute: 1.2 g (93 %) (Oel)

Der R_f-Wert der Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.68.

Man löst 1.02 g Z-N^{α}-BOC-N^{ε}-L-Lys-hydrazid in 10 ml abs. EtOH, gibt 0.3 ml (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd zu, läßt 5 Stunden bei 40°C und weitere 2 Stunden bei 0°C stehen, filtriert die gelblichen Kristalle ab, wäscht mit EtOH/H_2O (1:1) und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 1.1 g (88 %)

Smp.: 175 - 177°C

Der R_f-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.90.

XI. Z-N^{α}-Z-N^{ε}-L-Lys-Gly-hy-Sal (11c)

(11c) wird analog der Vorschrift für (10c) synthetisiert, die Ausbeuten der einzelnen Reaktionsstufen sind etwa gleich.

Der R_f-Wert von (11c) beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.91. (11c) wird aus abs. EtOH umkristallisiert.

Smp.: 162 - 164°C

XII. Z-L-Try-Gly-hy-Sal (12c)

a) Z-L-Try-Gly-OMethylester

Der Methylester wurde nach der Vorschrift von K. Hoffmann[1] hergestellt und in einer Ausbeute von 51 % erhalten (Smp. 156 - 158°C). Der R_f-Wert des Esters beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.83.

b) Z-L-Try-Gly-hydrazid

Man löst 6.75 g (16.5 mMol) Z-L-Try-Gly-OMethylester in 40 ml abs. MeOH unter leichtem Erwärmen, versetzt mit 20 g (2 Äquiv.) Hydrazinhydrat und läßt über Nacht bei 40°C stehen. Danach wird i.V. das Lösungsmittel abgedampft, mit 20 ml abs. MeOH aufgenommen, auf Zusatz von Äther/Petroläther kristallisiert und über konz. H_2SO_4 getrocknet.

Ausbeute: 4.84 g (71 %)

Smp.: 160 - 170°C

Es wird nochmals aus abs. MeOH/Ae/PeAe kristallisiert und über konz. H_2SO_4 getrocknet.

Ausbeute: 3.9 g (57.5 %)

Smp.: 174°C

Der R_f-Wert der chromatographisch reinen Substanz beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.60.

c) Z-L-Try-Gly-hy-Sal

Man löst 1 g (2.45 mMol) Z-L-Try-Gly-hydrazid in 20 ml abs. EtOH, gibt 0.33 g (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd zu, läßt über Nacht bei 40°C und einige Stunden bei 0°C stehen, filtriert die abgeschiedenen, gelblichen Kristalle ab, wäscht mit wenig abs. EtOH nach und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 1.1 g (88 %) (gelbliche, chromatogr. reine Kristalle)

Smp.: 186 - 188°C.

---

1) K. Hoffmann, JACS 80, 1486, 1958.

XIII. Z-L-His-L-Phe-hy (13b)

1. Z-L-His-L-Phe-Methylester

Z-L-His-azid

Man löst 0.606 g (2.0 mMol) Z-L-His-hydrazid in 6 ml 1N-HCl, gibt 8 ml Essigester zu, rührt und kühlt auf $0^{\circ}C$, versetzt diese Lösung mit 0.140 g (2.0 mMol) $NaNO_2$, gelöst in 0.5 ml H_2O. Nach 2 Minuten wird mit 2.4 ml 50 % K_2CO_3 neutralisiert, die wässerige Schicht abgetrennt, die organische Phase mit H_2O ausgewaschen und einige Minuten über $MgSO_4$ bei $0^{\circ}C$ getrocknet.

L-Phe-Methylester

Man suspendiert 0.43 g (2.0 mMol) L-Phe-Methylester. HCl in 8 ml Äther, kühlt auf $0^{\circ}C$ ab, gibt 3 ml 50 % K_2CO_3 zu, schüttelt, trennt die wässerige Schicht ab, wäscht die organische Phase mit wenig H_2O und trocknet über $MgSO_4$ bei $0^{\circ}C$.

Kupplung

Man gibt zu dieser Phenylalaninmethylesterlösung die Essigesterlösung des obig beschriebenen Azids, läßt das Gemisch über Nacht bei $0^{\circ}C$ stehen, filtriert den sich abscheidenden Niederschlag ab und kristallisiert aus MeOH/Ae um.

Ausbeute: 0.6 g (57.5 %)

Smp.: 160 - $163^{\circ}C$

Der R_f-Wert im System $HCCl_3$/MeOH 2:1 beträgt 0.75.

2. Z-L-His-L-Phe-hydrazid

Man löst unter Erwärmen 0.5 g Z-L-His-L-Phe-Methylester in 5 ml MeOH, gibt 0.17 ml NH_2-$NH_2 \cdot H_2O$ zu, läßt über Nacht bei ZT. stehen, filtriert die ausgefallenen Kristalle ab, kristallisiert nochmals aus abs. EtOH/Ae/Peae und trocknet die Kristalle über H_2SO_4.

Ausbeute: 0.3 g (60 %)

Smp.: 199 - $201^{\circ}C$.

XIV. Z-L-Glu(NH$_2$)-Gly-hy-Sal (16c)

a) Z-L-Glu(NH$_2$)-Gly-OEthylester

Die Synthese wird analog der Vorschrift für Z-L-Glu(NH$_2$)-L-Leu-O-Methylester durchgeführt.[1)]

Ausbeute: 65 %

Smp.: 150 - 152°C

b) Z-L-Glu(NH$_2$)-Gly-hydrazid

Man löst 1 g (2.84 mMol) Z-L-Glu(NH$_2$)-Gly-OEthylester in 20 ml Äthynol, versetzt mit 0.427 g (3 Äquiv.) Hydrazinhydrat, läßt über Nacht bei 40°C stehen und dampft das Lösungsmittel i.V. ab. Der ölige Rückstand wird mit H_2O versetzt, i.V. eingedampft und im Exsikkator über konz. H_2SO_4 getrocknet.

Ausbeute: 0.92 g (91 %) (Oel)

Der R_f-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.32

c) Z-L-Glu(NH$_2$)-Gly-hy-Sal

Man löst 0.5 g (1.42 mMol) Z-L-Glu(NH$_2$)-Gly-hy in 5 ml abs. EtOH, gibt 0.194 g (1.1 Äquiv.) Salicylaldehyd zu, läßt über Nacht bei 40°C stehen, filtriert die ausgefallenen, gelblichen Kristalle ab, wäscht mit wenig kaltem EtOH nach und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.48 g (74 %)

Smp.: 210 - 212°C.

---

1) E. Sondheimer, R.W. Holley, JACS 76, 2816 (1954)

E. Autokatalytische Umlagerung von Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH (19b)

a) 1 % Lösung

Man löst 0.5 g (1.1 mMol) Z-Glu(OH)-hy-L-Phe-H in 50 ml Dioxan (ein geringer nichtlöslicher Teil wird abfiltriert), läßt bei 40°C stehen und chromatographiert nach verschiedenen Zeiten. Dabei zeigt sich, daß nach 7 Tagen fast alles (19b) umgelagert ist. Man lyophylisiert die Lösung, kristallisiert den verbleibenden, weißen Rückstand aus abs. EtOH und trocknet die Kristalle über P_2O_5.

Ausbeute: 0.43 g (86 %)

Smp.: 179 - 181°C

Der MSmp. zeigt keine Depression.

Die R_f-Werte sind in den Systemen $HCCl_3$/MeOH (2:1) und 70 % Propanol identisch.

b) 0.1 % Lösung

Man löst 0.20 g (0.44 mMol) Z-L-Glu(OH)-hy-L-Phe-H in 200 ml Dioxan, läßt bei 40°C stehen und chromatographiert von Zeit zu Zeit. Nach ca. 30 Tagen ist fast alles Z-L-Glu(OH)-hy-L-Phe-H umgelagert; man dampft i. V. auf ca. 40 ml ein, lyophilisiert den Rest und kristallisiert den weißen Rückstand aus abs. EtOH. Nach mehrstündigem Stehen bei 0°C werden die weißen Kristalle abfiltriert, mit wenig kaltem abs. EtOH nachgewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.17 g (85 %)

Smp.: 179 - 181°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte sind in den Systemen $HCCl_3$/MeOH (2:1) (R_f = 0.15) und 70 % EtOH (R_f = 0.7) identisch.

F. Potentiometrische Titration zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH

I. Durchführung der Messung

Die den im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmten Dissoziationskonstanten (siehe Tabelle 2, S.28 und Tabelle 4, S.32) zugrundeliegenden potentiometrischen Titrationskurven wurden mit einem Titriergerät TTT_1 in Kombination mit einem Titrigraphen SBR der Firma Radiometer, Kopenhagen, aufgenommen. Das für die Messungen verwendete Elektrodensystem (Glas- und gesättigte Kalomelelektrode der Firma Radiometer) wurde mit einem Phosphatpuffer von pH 6.50 ± 0.02 geeicht.

Stammlösung

Man löst 598.6 mg Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH.HCl (MG 478.947) in 100 ml H_2O.
Von dieser Stammlösung werden jeweils 8 ml in ein 20 ml Becherglas gegeben, mit 0.1 ml 1N-HCl versetzt und danach mit 1N-NaOH titriert.

II. Meßergebnisse

1. Titration von Z-L-Glu(OH)-hy-L-PheH bei 25.4° ± 0.2°

Verbrauch 1N-NaOH ml.10^3	pH der Lösung	pK-Werte
125	3.75	4.22
150	4.25	4.24
175	4.70	4.22
225	6.47	6.92
250	6.95	6.95
275	7.40	6.92
325	9.25	9.72
350	9.70	9.70
375	10.20	9.76

2. Titration von Z-L-Glu(OH)-L-PheH bei 42.6°C + 0.2°

Verbrauch 1N-NaOh ml.10^3	pH der Lösung	pK-Werte
125	3.80	4.25
150	4.30	4.29
175	4.75	4.22
225	6.10	6.59
250	6.60	6.60
275	7.10	6.62
325	9.05	9.53
350	9.55	9.55
375	9.95	9.49

III. Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten

Die Berechnung der Dissoziationskonstanten aus obigen Titrationswerten erfolgte nach den Gleichungen:

$$K_1 = \frac{[H^+][c + H^+ + Na^+ - OH^- - Cl^-]}{[Cl^- + OH^- - Na^+ - H^+]}$$

$$K_2 = \frac{[H^+][Na^+ + H^+ - Cl^- - OH^-]}{[c + Cl^+ + OH^- - Na^+ - H^+]}$$

$$K_3 = \frac{[H^+][Na^+ + H^+ - OH^- - Cl^- - c]}{[2c + Cl^- + OH^- - Na^+ - H^+]}$$

(c = Konzentration der Verbindung)

Der in den Tabellen angegebene mittlere Bestimmungsfehler von ± 0.05 pK-Einheiten beruht auf einer Schätzung. Es wurde dabei versucht auch allfällige, durch die begrenzte Präzision der verwendeten Geräte bedingte systematische Fehler einzubeziehen.

G. Dünnschichtchromatographische Verfolgung der ADU von Aminodiacylhydrazinen mit Iminosäuren auf der aktiven Seite

Man löst jeweils 0.005 g der unten angegebenen Aminodiacylhydrazine in 0.95 ml DMA, gibt 0.05 ml Eisessig zu und läßt bei 40°C stehen. Die Abnahme der Aminodiacylhydrazine bzw. die Zunahme der Umlagerungsprodukte wird mit Hilfe des DC verfolgt. Mit einer Mikropipette werden ca. 10 µg Substanz aufgetragen. Als Fließmittel benützt man $HCCl_3$/MeOH (2:1). Die Chromatogramme werden mit Ninhydrin und Tolidin bzw. Tollens entwickelt.

Z-Gly-hy-GlyH
Umlagerungsdauer: ca. 18 Stunden

Z-Gly-hy-ProH
Umlagerungsdauer: ca. 21 Stunden

Z-Gly-hy-SarH
Umlagerungsdauer: ca. 4 Tage

Z-DL-Phe-hy-GlyH
Umlagerungsdauer: ca. 22 Stunden

Z-DL-Phe-hy-SarH
Umlagerungsdauer: ca. 4 Tage

Z-DL-Thre-hy-GlyH
Umlagerungsdauer: ca. 5 Tage

Z-DL-Thre-hy-SarH
Umlagerungsdauer: ca. 9 Tage

H. Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Racemisierung

I. Hydrolyse

Man versetzt 4.4 mg Z-DL-Thr-gly-hy bzw. Z-DL-Allothr-gly-hy mit 2 ml HCl (1:1), hydrolysiert während 5 Stunden bei 110°C im Bombenrohr, kühlt ab, bewahrt das Hydrolysat im Exsikkator über KOH-Perlen auf und löst, nachdem das Lösungsmittel verdampft ist, den Rückstand in 4 ml 50 % EtOH.

Ebenso werden 7.7 mg Z-DL-Thr-gly-hy bzw. Z-DL-Allothr-gly-hy (Umlagerungsprodukte) mit 8 ml HCl (1:1) hydrolysiert und die Rückstände mit 1 ml 50 % EtOH aufgenommen.

II. Chromatographie

Für den dünnschichtchromatographischen Nachweis von Threonin und Allothreonin nebeneinander benützen wir die BN-KAMMER.[1] Die verwendeten Platten werden mit Merck G-Kieselgel bestrichen und vor Gebrauch während 1 Stunde bei 110°C aktiviert. Als mobile Phase dient uns das geänderte System von T.L. Hardy und D.C. Holland[2]: Morpholin/H_2O/Methyl-Äthylketon/n-Butanol 1:2; 5:5. Die Laufzeit beträgt 6 Stunden, danach werden die Platten getrocknet und mit Ninhydrin und Tolidin entwickelt. Von den Lösungen der hydrolysierten Substanzen trägt man mit einer Mikropipette soviel ml auf, wie den in Fig. 2 angegebenen Mengen entsprechen.

Mit dieser Methode lassen sich noch 1.1 µg Threonin neben 77 µg Allothreonin und umgekehrt nachweisen. Die Racemisierung ist daher sicher kleiner als 2.8 %.

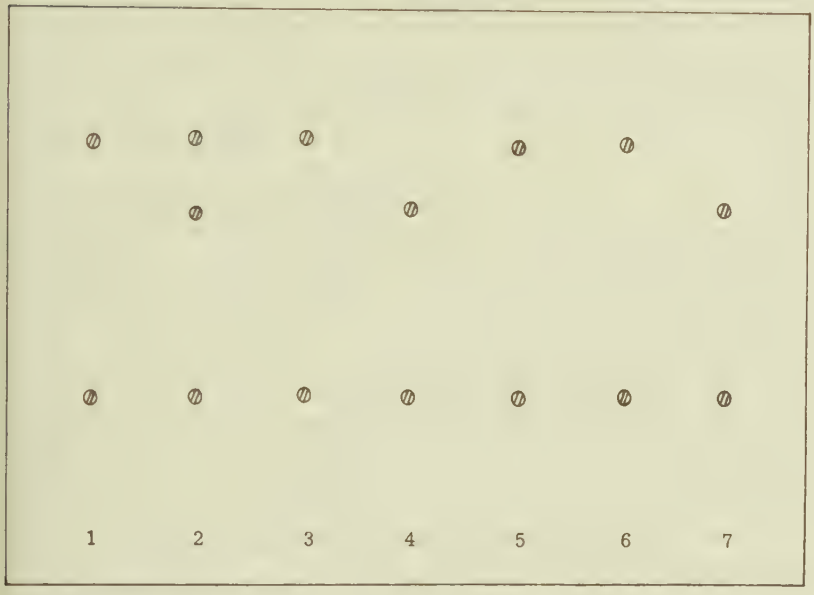
1) M. Brenner, A. Niederwieser, Exper. 17, 237 (1961)

2) T.L. Hardy, D.C. Holland, Chemistry and Industry 32, 517 (1954)

Dünnschichtchromatographische Trennung von Thr und Allothr

Umlagerung von Z-DL-Thr-hy-GlyH

Fig. 2

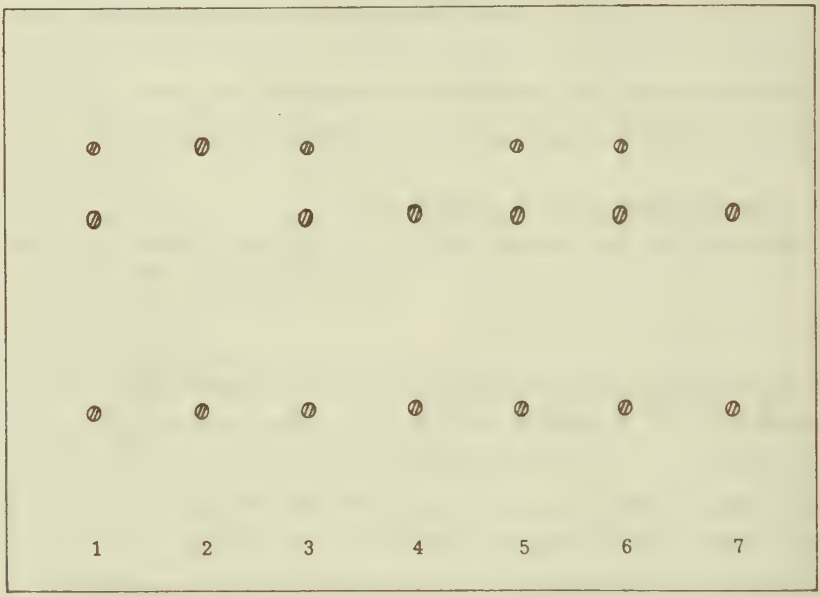


No:	Substanz (alles in µg)	R_f-Werte
1)	77 DL-Thr (Vergleich)	0.73
2)	77 DL-Thr (Umlagerung)	0.74
	1.1 DL-Allothr (Vergleich)	0.60
3)	77 DL-Thr (Umlagerung)	0.74
4)	77 DL-Allothr (Vergleich)	0.60
5)	77 DL-Thr (Umlagerung)	0.73
6)	77 DL-Thr (Umlagerung	0.73
7)	1.1 DL-Allothr (Vergleich)	0.24
	Glycin	

Dünnschichtchromatographische Trennung von Thr und Allothr

Umlagerung von Z-DL-Allothr-hy-GlyH

Fig. 3



No:	Substanz (alles in µ h)		R_f-Werte
1)	77	DL-Allothr (Umlagerung)	0.60
	1.1	DL-Thr (Vergleich)	0.73
2)	77	DL-Thr (Vergleich)	0.74
3)	77	DL-Allothr (Umlagerung)	0.60
	1.1	DL-Thr (Vergleich)	0.73
4)	77	DL-Allothr (Umlagerung)	0.61
5)	77	DL-Allothr (Umlagerung)	0.60
	1.1	DL-Thr (Vergleich)	0.73
6)	77	DL-Allothr (Vergleich)	0.60
	1.1	DL-Thr (Vergleich)	0.73
7)	77	DL-Allothr (Umlagerung)	0.60
		Glycin	0.24

I. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Glycindiketopiperazin als Nebenprodukt bei der ADU

Der Nachweis, daß Glycindiketopiperazin als Nebenprodukt bei der ADU auftritt, wurde beispielsweise bei der Umlagerung von Z-DL-Ser-hy-GlyH erbracht. Man löst 0.5 g Z-DL-Ser-hy-GlyH in 2 - 5 ml Eisessig, verdünnt mit 47.5 ml Dioxan, läßt 23 Stunden bei 40° stehen und chromatographiert die Lösung wie folgt:

Zweidimensionale Chromatographie

Man trägt auf eine Dünnschichtplatte in die untere, linke Ecke ca. 1 µg Diketopiperazin, gelöst in H_2O auf. Auf eine andere Platte trägt man mit einer Mikropipette 2 Mikroliter der oben erwähnten Umlagerungslösung auf. Auf eine dritte Platte trägt man auf den gleichen Punkt die erwähnte Menge Umlagerungslösung und ca. 1 µg Glycindiketopiperazin, gelöst in H_2O auf. Zuerst läßt man die Platten im System $HCCl_3$/MeOh (2:1) 10 cm laufen, trocknet danach bei 100°C einige Minuten, dreht die Platten um 90° und läßt sie im System Propanol/H_2O (7:3) ebenfalls 10 cm laufen. Man entwickelt die Platten mit Ninhydrin und Tolidin. Dabei zeigt sich, daß Glycindiketopiperazin und das unbekannte Nebenprodukt sich im zweidimensionalen System nicht trennen; ihr identischer R_f-Wert beträgt im:

System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 3.6
System Pro-OH/H_2O (7:3) 5.0

K. Pd-Katalysierte Oxydation von Hydraziden

I. Oxydation von Acetylhydrazid

1. In Gegenwart von Luft

Man löst 1 g (13.5 mMol) Acetylhydrazid in 5 ml AcOH, verdünnt mit 95 ml Dioxan, gibt 3 g Pd-Kohle zu und rührt während 30 Stunden bei 40°C. Wie das DC zeigt, ist nach dieser Zeit kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden; es hat sich eine neue Substanz gebildet, die Ninhydrin und Tollens negative, Tolidin hingegen positive Reaktionen zeigt. Das Gemisch wird durch Cellit filtriert, mit Dioxan nachgewaschen, die Lösung bei 40°C i.V. eingedampft und aus Alkohol/Äther kristallisiert. Die weißen Kristalle werden abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 0.71 g (91 %)
Smp.: 136 - 138°

Bei der isolierten Substanz handelt es sich um N,N'-Di-acetylhydrazin. Das Vergleichspräparat stellten wir durch Umsatz von Ac_2O mit Acetylhydrazid her.
Der MSmp. zeigt keine Depression. Das DC zeigt identische R_f-Werte. Die IR-Spektren sind identisch.

2. N_2-Atmosphäre

Der im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Versuch wird nun unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Wie das DC zeigt, hat sich N,N'-Diacetylhydrazin nur in Spuren gebildet. Das Hauptprodukt ist unverändertes Acetylhydrazid. Das gleiche Ergebnis erhält man bei Durchführung des Versuches unter H_2-Atmosphäre.

3. O_2-Atmosphäre

Man löst 0.1 g (1.35 mMol) Acetylhydrazid in 0.5 ml AcOH, verdünnt mit 10 ml Dioxan, gibt 0.3 g Pd-Kohle zu und leitet bei ZT. einen O_2-Strom durch das Gemisch. Laut DC ist nach 8 Stunden alles Acetylhydrazid umgesetzt. Man filtriert vorsichtig durch Cellit ab, wäscht mit Dioxan nach,

dampft die Lösung i.V. ein, kristallisiert den weißen Rückstand aus Alkohol/Äther und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.06 g (77 %)

Smp.: 136 - 138°

Bei Durchführung des gleichen Versuches, jedoch ohne Pd-Kohle, kann man praktisch nur Ausgangsmaterial isolieren. Das DC zeigt, daß sich nur wenig N,N'-Diacetylhydrazin gebildet hat.

II. Anwendung in der Peptidsynthese

1. Hippuryl-Glycin

Man löst 0.5 g (2.59 mMol) Hippurylhydrazid in 40 ml H_2O, versetzt mit 0.15 g (1 Äquiv.) Glycin, gelöst in 10 ml H_2O + 1 Äquivalent 1N-NaOH, fügt 1.5 Pd-Kohle zu und läßt bei ZT. einen O_2-Strom durchströmen. Laut DC ist nach 2 1/2 Stunden kein Hippurylhydrazid mehr vorhanden. Man stellt die Lösung mit 2N-HCl auf pH 2, filtriert durch Cellit, wäscht mit heißem H_2O nach, dampft die Lösung i.V. ein, nimmt den festen, gelblichen Rückstand in heißem H_2O auf, filtriert von wenig Ungelöstem ab und läßt über Nacht bei ZT. stehen. Es bilden sich lange, weiße Nadeln, die abfiltriert und über P_2O_5 getrocknet werden.

Ausbeute: 0.25 g (40.5 %)

Smp.: 193 - 197°C

Nach nochmaligem Kristallisieren aus H_2O beträgt der Smp.: 200-203°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Das DC zeigt identische R_f-Werte. Die IR-Spektren sind identisch. Zur Analyse wird aus H_2O kristallisiert und 16 Stunden bei 65°C und 0.03 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{11}H_{12}O_4N_2$ (236.233)		C	H	N
	gef.	55.93	5.12	11.86
	ber.	56.18	5.32	11.78

2. Benzyloxycarbonyl-Glycyl-L-Phenylalanin

Man löst 0.5 g (2.14 mMol) Benzyloxycarbonyl-Glycinhydrazid in 50 ml H_2O, gibt eine Lösung von 1.11 g (3 Äquiv.) L-Phenylalanin + 1 Äquivalent Et_3N in 10 ml H_2O zu, fügt noch 1.5 g Pd-Kohle zu und läßt bei ZT. einen O_2-Strom durchströmen. Nach 2 1/2 Stunden ist kein Hydrazid mehr vorhanden; man stellt mit 2N-HCl auf pH 2, filtriert die Lösung durch Cellit und wäscht mit heißem Essigester nach. Man trennt die wässerige Schicht ab, schüttelt die organische Phase einige Male mit 2N-HCl, wäscht mit H_2O neutral, trocknet über $MgSO_4$, dampft die Lösung i.V. ein, nimmt den öligen Rückstand mit Essigester auf und versetzt mit Petroläther bis zur Trübung. Nach Stehen über Nacht bei 0^oC filtriert man den weißen Niederschlag ab und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.30 g (39 %)
Smp.: 122 - 125°

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte des DC sind identisch.

3. Benzyloxycarbonyl-Glycyl-DL-Phenylalaninmethylester

Man löst 0.5 g (2.14 mMol) Z-Gly-hy- in 50 ml H_2O, gibt eine Lösung von 0.46 g (1 Äquivalent) DL-Phenylalaninmethylester-Hydrochlorid + 1 Äquivalent Et_3N in 10 ml Dioxan zu, fügt noch 1.5 g Pd-Kohle zu und läßt bei ZT. einen O_2-Strom durchfließen. Nach ca. 2 1/2 Stunden ist laut DC kein Hydrazid mehr vorhanden. Man filtriert die Lösung durch Cellit, wäscht mit heißem Essigester nach, trennt die wässerige Schicht ab, wäscht die organische Phase mit 2N-HCl und H_2O, trocknet über $MgSO_4$ und dampft i.V. ein. Das verbleibende, gelbliche Oel wird aus Essigester/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 0.30 g (36 %) (weiße Nadeln)
Smp.: 83°C

Der MSmp. zeigt keine Depression. Die R_f-Werte des DC sind identisch. Zur Analyse wird aus Essigester/PeAe kristallisiert und 20 Stunden bei 75°C und 0.02 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{20}H_{22}N_2O_5$ (370.412)		C	H	N
	gef.	65.09	6.24	7.54
	ber.	64.85	5.99	7.56

Das DC zeigt, daß sich neben den gewünschten N-Acyl-Dipeptiden bzw. -Dipeptidester noch weitere Produkte bilden. Sie wurden weiter nicht untersucht, mit Ausnahme bei der Kupplungsreaktion von Hippurylchlorid mit Glycin. Hier zeigte ein Nebenprodukt dünnschichtchromatographisch (System $HCCl_3$/MeOH (2:1)) identisches Verhalten mit N,N'-Dihippurylhydrazin.

L. Titration von Cystein- und Methioninderivaten mit Hypobromit

I. Reagens, Titerbestimmung und Indikator

Reagens:

0.80 g Brom werden in 1000 ml 0.1 N Natronlauge gelöst. Die leicht gelb gefärbte Hypobromitlösung ist ca. 0.005 molar. Sie kann im Dunkeln mehr als 2 Monate aufbewahrt werden, ohne daß sich ihr Titer merklich verändert.

Titerbestimmung:

Die Bestimmung der Hypobromitlösung erfolgt durch Titration von 10.0 ml einer 0.002 molaren Hydrazinsulfatlösung (260.24 mg Hydrazinsulfat p.A. in 1000 ml H_2O) und 5 ml 2N-H_2SO_4. Der Verbrauch einer genau $5.00.10^{-3}$ molaren Hypobromitlösung beträgt dabei 8.00 ml.

Indikator:

Als Indikator dient Methylrot (50 mg Methylrot in 100 ml 60 % EtOH). Man gibt 3 Tropfen des Indikators zu der zu titrierenden Lösung. Am Äquivalenzpunkt wird der Indikator schlagartig entfärbt.

II. Durchführung der Titrationen

1. Substanzen

Um eindeutige Resultate bei der Titration von Methionin- bzw. Cysteinderivaten mit Hypobromit zu erhalten, werden nur Analysenpräparate verwendet.

1) Bz-S-Z-N-L-Cys-Gly-hydrazid

Z-DL-Met-Gly-hydrazid

vergleiche die Daten der aus der Umlagerung erhaltenen Substanzen.

2) Bz-S-Z-N-L-Cys-hydrazid

$C_{18}H_{21}N_3O_3S$		C	H	N
(359.456)	gef.	60.30	6.04	11.69
	ber.	60.16	5.89	11.69

3) Z-DL-Met-hydrazid		C	H	N
$C_{13}H_{14}O_3N_3S$	gef.	52.67	6.64	14.14
(292.345)	ber.	52.51	6.44	14.13

4) BZ-S-Z-N-L-Cys		C	H	N
$C_{18}H_{19}NO_4S$	gef.	62.74	5.76	3.93
(345.424)	ber.	62.60	5.55	4.06

5) Z-DL-Met		C	H	N
$C_{13}H_{17}O_4NS$	gef.	55.33	6.25	4.81
(283.353)	ber.	55.12	6.05	4.95

2. Titereinstellung

10.0 ml einer 0.002 molaren NH_2-$NH_2 \cdot H_2SO_4$ verbrauchten 8.60 ml Hypobromitlösung. 5 ml H_2SO_4 + 2 Tropfen Methylrot verbrauchen 0.01 ml Hypobromitlösung (Blindwert), was von obigem Verbrauch abzuziehen ist. Die Hypobromitlösung ist also $4.656 \cdot 10^{-3}$ molar (Faktor 0.9313).

3. Messungen

Man löst die zu titrierenden Substanzen in einem 10 ml Meßkolben in Dioxan und zwar derart, daß die genau bekannte Molarität der Lösung zwischen 0.1 - 0.4 liegt. Von einer solchen Lösung gibt man 1 ml in ein Bechergläschen, versetzt mit 5 ml 2N-H_2SO_4 (Fixanal) und 3 Tropfen Methylrot, rührt bei ZT. mit einem Magnetrührer und titriert mit Hilfe einer Kolbenbürette, deren Spitze zur Kapillare ausgezogen ist und direkt in die Lösung eintaucht.

Der Hypobromitverbrauch für 1 ml Dioxan + 5 ml 2N-H_2SO_4 + 3 tropfen Methylrot beträgt 0.03 ml, dies ist vom Gesamtverbrauch abzuziehen. Die in Tabelle 7 angegebenen Werte für den effektiven Verbrauch an Hypobromit sind Durchschnittswerte aus jeweils 8 Messungen.

Tabelle 7

Verbindung	Konzentration (Mol/l)	effekt. Verbrauch (ml)	Theor. Verbrauch (ml)	% Fehler
Bz-S-Z-N-L-Cys-Gly-hy	$1.\ 99.10^{-2}$	11.65	11.94	2.44
Z-DL-Met-Gly-hy	$1.245.10^{-2}$	7.65	7.47	2.4
Z-DL-Met-hy	$3.619.10^{-2}$	21.84	21.71	0.60
Bz-S-Z-N-L-Cys-hy	$1.950.10^{-2}$	12.27	11.72	4.6
Z-DL-Met-OH	$3.307.10^{-2}$	6.71	6.62	1.3
BZ-S-Z-N-L-Cys-Gly-OEtester *	$1.017.10^{-2}$	2.01	2.03	0.9
Z-DL-Met-Gly-OEtest.	$0.897.10^{-2}$	1.84	1.79	3.8

* Da 1 ml der $1.017.10^{-2}$molaren Bz-S-N-Z-L-Cys-Gly-OEtester-Lösung in 5 ml 2N-H_2SO_4 einen Niederschlag ergibt, muß noch 0.8 ml Dioxan zugegeben werden. Vom erhaltenen Meßwert muß deshalb nun der Hypobromitverbrauch einer Lösung von 1.8 ml Dioxan + 5 ml 2N-H_2SO_4 + 3 Tropfen Methylrot abgezogen werden; er beträgt 0.04 ml und ist im angegebenen Wert der Tabelle 7 schon verrechnet.

Bei der Titration von Met wird H_2O als Lösungsmittel zur Herstellung der Stammlösung verwendet (38.3 mg Met in 10 ml H_2O). Es wird jeweils 1 ml dieser Lösung mit 5 ml 2N-H_2SO_4 + 3 Tropfen Methylrot versetzt und titriert.

Verbindung	Titr. Zeit (Min)	Konzentration (Mol/l)	effekt. Verbrauch (ml)	Korr. Verbrauch (ml)	% Fehler
Met 2 ml Met	3	$2.57.10^{-2}$	5.11	5.14	0.5
+ 3mg Gly + 3mg Ala + 3mg Leu	3	$2.57.10^{-2}$	10.20	10.28	0.7

Versetzt man die zu titrierende Lösung mit Tyrosin- oder Tryptophanverbindungen, so wirken diese störend und man erhält nicht die vorausberechneten Mengen an Hypobromit. Ob nun die Tyrosin- oder Tryptophanverbindungen, ebenso wie Methion- bzw. Cystein-Derivate mit Hypobromit titriert werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

M. Herstellung neuer Ausgangsmaterialien

I. Benzyloxycarbonyl-L-Prolinhydrazid

Man löst 19.45 g (73.9 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-Prolin-methylester in 40 ml abs. MeOH, versetzt bei 0°X mit 5.53 ml (1.5 Äquiv.) Hydrazinhydrat, läßt die Lösung 4 Tage bei 0°C stehen, dampft die Lösung i.V. ein, gibt zum öligen Rückstand H_2O und dampft i.V. wiederum ein. Das leicht gelbliche Oel wird während der Nacht über P_2O_5 am HV getrocknet. Versuche, das Oel zu kristallisieren, hatten keinen Erfolg. Das Oel ist chromatographisch rein und zeigt eine Tollens positive Reaktion.

Ausbeute: 19.04 g (gelbliches Oel) (98 %)

II. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ε}-tert. Butyloxycarbonyl-L-Lysinhydrazid

Man löst 8.609 g (21.8 mMol) N^{α}-Z-N^{ε}-BOC-L-Lys-Methylester in 40 ml abs. EtOH, versetzt mit 3.2 ml Hydrazinhydrat, läßt 24 Stunden bei 40°C stehen, dampft danach die Lösung i.V. ein, nimmt den Rückstand mit EtOH auf und kristallisiert auf Zusatz von H_2O. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Eiswasser ausgewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 8.3 g (96.5 %) (weiße Nadeln)

Smp.: 119 - 120°C

Zur Analyse wird aus EtOH/H_2O kristallisiert und während 14 Stunden bei 70°C und 0.02 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{19}H_{30}N_4O_5$ (394.481)		C	H	N
	gef.	58.10	7.88	14.13
	ber.	57.85	7.67	14.20

III. Benzyloxycarbonyl-L-Asparagin-Methylester

Man löst 4 g Z-L-Asparagin in 200 ml abs. MeOH und tropft bei 0°C eine ätherische Diazomethanlösung zu. Nach Zugabe einer Menge ätherischer Diazomethanlösung bildet sich ein weißer Niederschlag; die Lösung wird daher i.V. eingeengt, nochmals mit 200 ml abs. MeOH aufgenommen und wiederum mit Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Die Lösung wird i.V. eingedampft und aus Essigester/Petroläther kristal-

lisiert.

Ausbeute: 3.98 g (94 %)

Smp.: 147°C

Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und bei 75°C und 0.04 Torr 18 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{13}H_{16}O_5N_2$		C	H	N
(280.287)	gef.	55.92	5.75	10.11
	ber.	55.71	5.75	10.00

IV. Benzyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure-dihydrazid

Man löst 3.6 g (12.8 mMol) Z-L-Asparaginmethylester in 50 ml abs. MeOH, gibt 1.9 ml (3 Äquivalent) Hydrazinhydrat zu, läßt bei ZT. 16 Stunden stehen wobei ein weißer Niederschlag ausfällt. Die Lösung wird noch 2 Stunden bei 0°C stehen gelassen, danach abfiltriert, den weißen Niederschlag mit kaltem H_2O ausgewaschen, über P_2O_5 getrocknet und aus abs. MeOH kristallisiert.

Ausbeute: 3.4 g (90 %)

Smp.: 161 - 163°C

Zur Analyse wird aus abs. MeOH kristallisiert und bei 70°C und 0.05 Torr 16 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{12}H_{17}O_4N_5$		C	H	N
(295.308)	gef.	48.99	5.84	23.75
	ber.	48.80	5.80	23.72

V. Benzyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure-α-hydrazid-βBenzylester

5.3 g (14.9 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure-β-Benzylester und 1.95 g (14.9 mMol) BOC-hydrazin werden in 40 ml Methylenchlorid gelöst und eine Lösung von 3.08 ml (14.9 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid (in 30 ml Methylenchlorid gelöst) zugegeben. Die Suspension wird bei Zimmertemperatur 2 Stunden gerührt, der sich bildende Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit Methylenchlorid ausgewaschen, das klare Filtrat im Vakuum eingedampft, den Rückstand mit ca. 200 ml Chloroform (mit HCl-Gas ge-

sättigt) aufgenommen und 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Lösung wird danach im Vakuum zur Trockene eingedampft, nochmals mit ca. 100 ml Chloroform (HCl-Gas gesättigt) aufgenommen und 1 Stunde stehen gelassen. Danach wird das $HCCl_3$ i.V. abgedampft, der weiße Rückstand in H_2O gelöst, auf 0^oC abgekühlt und verdünnten Ammoniak zutropfen lassen bis pH 7. Die Lösung wird i.V. eingedampft und das $EtOH/H_2O$ kristallisiert.

Ausbeute: 4.1 g (74 %)

Smp.: 115 - 116°C

Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und bei 65^oC und 0.03 Torr 16 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{19}H_{21}O_5N_3$		C	H	N
(371.401)	gef.	61.59	5.87	11.47
	ber.	61.44	5.70	11.32

VI. Benzyloxycarbonyl-L-Asparagin-hydrazid

2.22 g (6 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure-α-hydrazid-β-Benzylester werden in wenig H_2O gelöst und mit einem gleichen Volumen von conc. NH_3 versetzt. Dabei kristallisiert eine weiße Substanz aus, die nach einer Stunde Stehen abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert wird.

Ausbeute: 1.05 g (63 %)

Smp.: 198 - 199°C

Zur Analyse wird aus MeOH kristallisiert und bei 75^o und 0.04 Torr 18 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

Danach beträgt der Schmelzpunkt: 201^oC.

$C_{12}H_{16}O_4N_4$		C	H	N	O
(280.292)	gef.	51.31	5.84	20.01	23.03
	ber.	51.42	5.75	19.99	22.83

VII. Benzyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure-α-hydrazid

Man löst 0.25 g (0.67 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-Asparaginsäure-α-hydrazid-β-benzylester in 10 ml MeOH, gibt 6.75 ml 0.1N-NaOH zu, läßt 10 Minuten bei ZT. stehen, neutralisiert danach mit 6.75 ml o.1N-HCl und

dampft i. V. ein. Der weiße Rückstand wird mit wenig abs. EtOH aufgenommen, von Unlöslichem abfiltriert und durch Zusatz von Äther kristallisiert.

Ausbeute: 0.12 g (64 %)

Smp.: 114 - 116°C

Der R_f'-Wert beträgt im System $HCCl_3$/MeOH (2:1) 0.1.

Zur Analyse wird aus abs. EtOH/Ae kristallisiert und während 18 Stunden bei 70° und 0.02 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{12}H_{15}O_5N_3$		C	H	N
(281.276)	gef.	50.97	5.50	14.69
	ber.	51.24	5.37	14.94

VIII. Tricarbobenzoxy-L-Argininmethylester

Man löst 4.40 g (7.63 mMol) Tricarbobenzoxy-L-Arginin in 150 ml abs. EtOH und läßt unter Eiskühlung eine ätherische Diazomethanlösung zutropfen. Es fällt ein weißer Niederschlag aus, die Lösung wird i.V. eingedampft, mit abs. EtOH aufgenommen und wiederum Diazomethanlösung zutropfen lassen bis zur bleibenden Gelbfärbung. Danach dampft man i.V. ein und kristallisiert aus abs. EtOH.

Ausbeute: 3.84 g (85.4 %)

Smp.: 108°C

Zur Analyse wird aus abs. EtOH kristallisiert und bei 70°C und 0.1 Torr während 18 Stunden über P_2O_5 getrocknet.

$C_{31}H_{34}O_8N_4$		C	H	N
(590.645)	gef.	63.29	5.90	9.48
	ber.	63.04	5.80	9.48

IX. Tricarbobenzoxy-L-Arginincyanmethylester

Man löst 5.75 g (10 mMol) Tricarbobenzoxy-L-Arginin in 10 ml Chloracetonitril, gibt 2.5 ml (18 mMol) Triäthylamin zu und erhitzt während 4 Stunden auf 80°C. Man dampft danach die Lösung i. V. zur Trockene ein, nimmt den festen gelblichen Rückstand in Essigester auf, wäscht die Essigesterlösung nacheinander mit H_2O, 1N-HCl, 1N-$NaHCO_3$ und H_2O, trocknet über

Na_2SO_4 und dampft i.V. zur Trockene ein. Der Rückstand wird aus Essigester/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 5.1 g (83 %)

Smp.: 92 - 94°C

Zur Analyse wird aus MeOH/Ae kristallisiert und während 18 h bei ZT. und 0.03 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{32}H_{33}O_8N_5$		C	H	N
(615.656)	gef.	62.43	5.59	11.30
	ber.	62.43	5.40	11.38

X. Tricarbobenzoxy-L-Argininhydrazid

Man löst 0.5 g (0.8 mMol) Tricarbobenzoxy-L-Arginin-cyanmethylester in 20 ml abs. MeOH und versetzt mit 0.121 ml (3 Äquiv.) Hydrazinhydrat. Sofort fällt ein weißer Niederschlag aus. Man läßt noch 2 Stunden bei ZT. und eine weitere Stunde bei 0°C stehen, filtriert ab, wäscht den weißen Niederschlag mit Eiswasser aus und trocknet über P_2O_5.

Ausbeute: 0.45 g (93.8 %)

Smp.: 148 - 150°C

Zur Analyse wird aus abs. MeOH kristallisiert und während 16 Stunden bei 70°C und 0.03 Torr über P_2O_5 getrocknet.

$C_{30}H_{34}O_7N_6$		C	H	N
(590.650)	gef.	61.25	6.01	14.12
	ber.	61.00	5.80	14.23

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Beschreibung der Aminodiacylumlagerung (ADU) wird einfachheitshalber eine neue Terminologie eingeführt: Passiver Aminosäurerest in einem α-Aminodiacylhydrazin ist derjenige, der durch die Aminogruppe der aktiven Aminosäure aus seiner Bindung mit dem Hydrazinstickstoff verdrängt wird.

Mit Ausnahme von Arginin, Asparaginsäure und Hydroxyprolin sind sämtliche im Eiweiß vorkommende Aminosäuren in passive Stellung eingeführt worden. Untersuchungen über die Abhängigkeit der Umlagerungsgeschwindigkeit von der Struktur der passiven Aminosäure ergeben, daß eine Verzweigung am β-Kohlenstoff der passiven Aminosäure die Reaktion stark verlangsamt, weiter entfernte voluminöse Gruppen dagegen weder fördernd noch hemmend wirksam sind. Mit Ausnahme des γ-Carboxyls der Glutaminsäure sind die sogenannten funkionellen Gruppen in den Aminosäure-Seitenketten ohne Einfluß auf den Reaktionsverlauf. Die Umlagerung von Z-L-Glu-hy-L-PheH verläuft insofern "autokatalytisch", als sowohl Ausgangsmaterial, wie Endprodukt die Gruppe -COOH enthalten, von der wir wissen, daß sie z.B. in Form einer zugesetzten Carbonsäure RCOOH die Umlagerung katalysiert. In der aktiven Aminosäure darf die primäre Aminogruppe durch die sekundäre von Sarcosin und Prolin ersetzt werden.

In einem Anhang wird die Pd-katalysierte Luftoxydation von N-Acylaminosäurehydraziden beschrieben und gezeigt, daß sie zu einem aktivierten N-Acylaminoacyl-Rest führt, der zur Acylierung von Aminen verwendet werden kann.
Schließlich wird eine neue Möglichkeit zur Titration von Methionin- bzw. Cysteinderivaten beschrieben.

Curriculum vitae

Am 22. Mai 1940 wurde ich, Günther Willi Tscheulin, als Sohn des Max Tscheulin, Kaufmann, von Binzen, und der Magda, geb. Flügel, in Lörrach geboren. In Weil a. Rhein besuchte ich die Primalschule und anschließend das Hans-Thoma Gymnasium in Lörrach, wo ich 1959 das Abitur bestand. Im Sommersemester 1959 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und belegte Chemie als Hauptfach und Mathematik, Physik, physikalische Chemie und Mineralogie als Nebenfächer. Im April 1962 bestand ich das erste Vordiplom (Mathematik, Mineralogie), im Oktober 1963 das zweite Vordiplom (anorganische Chemie, organische Chemie, Physik) und im April 1964 das Diplom-Examen.

Die vorliegende Doktorarbeit begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Brenner im Mai 1964.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika folgender Dozenten:
P. Bearth, M. Brenner, K. Bucher, P. Buchner, H. Dahn, H. Erlenmeyer, S. Fallab, C.A. Grob, P. Huber, W. Kuhn, A. Marxer, H. Nüesch, A. Portmann, T. Reichstein, P. Schiess, Ch. Tamm, E. Wenk, R. Wizinger.

Bönecke-Druck - Clausthal-Zellerfeld, Postfach 29